


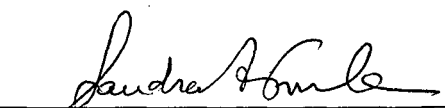
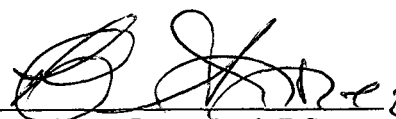
## TERMO DE APROVAÇÃO

### ESTUDO DO MEIO E DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ENDO-INULINASE MICROBIANA

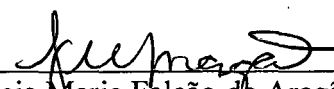
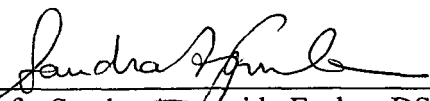
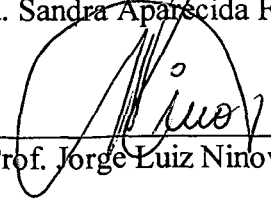
Por

Regina Maria Miranda Gern

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jorge Luiz Ninow, DSc  
Orientador  
\_\_\_\_\_  
Profa. Sandra Aparecida Furlan, DSc  
Co-orientadora  
\_\_\_\_\_  
Prof. Humberto Jorge José, DSc  
Coordenador do Curso

#### BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Glaucia Maria Falcão de Aragão, DSc  
\_\_\_\_\_  
Prof. Bóris Ugarte Stambuk, DSc  
\_\_\_\_\_  
Profa. Sandra Aparecida Furlan, DSc  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jorge Luiz Ninow, DSc

FLORIANÓPOLIS, 09 DE SETEMBRO DE 1998.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO DO MEIO E DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA**  
**PRODUÇÃO DE ENDO-INULINASE MICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Professor Doutor Jorge Luis Ninow

Co-orientadora: Doutora Sandra Aparecida Furlan

REGINA MARIA MIRANDA GERN

FLORIANÓPOLIS - SC

1998

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **ESTUDO DO MEIO E DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ENDO-INULINASE MICROBIANA**

Por

Regina Maria Miranda Gern

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Jorge Luiz Ninow, DSc  
Orientador

---

Profa. Sandra Aparecida Furlan, DSc  
Co-orientadora

---

Prof. Humberto Jorge José, DSc  
Coordenador do Curso

#### **BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Glaucia Maria Falcão de Aragão, DSc

---

Prof. Bóris Ugarte Stambuk, DSc

---

Profa. Sandra Aparecida Furlan, DSc

---

Prof. Jorge Luiz Ninow, DSc

**FLORIANÓPOLIS, 09 DE SETEMBRO DE 1998.**

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos laboratórios do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CDB) em Joinville, SC.



Aos meus pais,

Vocês foram, indiretamente, os principais responsáveis pela elaboração deste trabalho.

Ao Celso, Ana Clara e Gabriel

Na busca das realizações é preciso acreditar no sonho. A transformação do sonho em realidade torna-se mais fácil quando se tem ao lado pessoas que acreditam e contribuem na edificação de nossos anseios.

Agradeço à minha família que soube conviver com os períodos de ausência e pouca participação na vida familiar, bem como compreender as ansiedades e medos de quem está realizando uma pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Jorge Ninow, pela orientação deste trabalho.

À amiga e co-orientadora Dra. Sandra Furlan, pela orientação, incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Glaucia Maria Falcão de Aragão e Dr. Bóris Ugarte Stambuk, por aceitarem revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta dissertação.

Aos amigos José Miguel, Daniele, Fátima, Andréa, Roselene e Gisele, pelos conselhos, estímulo e ajuda prestados.

Aos demais pesquisadores, colegas e funcionários do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico e da Universidade Federal de Santa Catarina, muito obrigada pela atenção sempre presente nos momentos necessários.

A todos os colegas do curso de Mestrado, em especial Marcinha, Caxa e Jaqueline, cuja amizade e carinho foram responsáveis por momentos de alegria e descontração.

Aos professores Dr. Valdir Vegini e MSc. Mariluci Neis Carelli, e a todos da Univille que de alguma forma apoiaram a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS</b>	v
<b>NOMECLATURA</b>	vii
<b>RESUMO</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
<b>II.1. INULO-OLIGOSSACARÍDEOS (oligômeros de frutose)</b>	4
II.1.1. Ocorrência e distribuição	5
II.1.2. Produção	5
II.1.3. Características usuais e aplicações comerciais	10
II.1.3.1. Propriedades físicas e químicas	10
II.1.3.2. Não - digestibilidade	10
II.1.3.3. Utilização seletiva pelas bactérias do intestino	11
<b>II.2. INULINA</b>	13
II.2.1. Propriedades	13
II.2.2. Utilização industrial	16
II.2.2.1. Transformações sem hidrólise prévia	17
II.2.2.2. Transformações por hidrólise parcial	18
II.2.2.3. Transformações por hidrólise total	18
<b>II.3. INULINASES</b>	19
II.3.1. Características das endo-inulinases	20
II.3.1.1. Inulinases fúngicas	20
II.3.1.2. Inulinases bacterianas	22
II.3. 2. Ação da endo-inulinase sobre a inulina	23
<b>II.4. PRODUÇÃO DE INULINASES POR MICRORGANISMOS</b>	24
II.4.1. Microrganismos produtores	24
II.4.1.1. Leveduras	24
II.4.1.2. Fungos filamentosos	25

II.4.1.3. Bactérias	26
II.4.2. Fatores que afetam o crescimento microbiano e a atividade enzimática	27
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
III.1. MICRORGANISMO	30
III.1.1. Manutenção da cultura	30
III.2. MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	32
III.2.1. Seleção de Fungos Produtores de Inulinases	32
III.2.2. Seleção de fungos produtores de endo-inulinases	33
III.2.3. Comparação entre o fungo selecionado e as linhagens bacterianas isoladas, quanto à produção de endo-inulinases	34
III.2.4. Otimização do teste de hidrólise enzimática da inulina	35
III.2.5. Definição do meio de cultivo	35
III.2.6. Substituição da inulina comercial por extrato de chicória	37
III.2.6.1. Preparo do extrato de chicória	37
III.2.6.2. Utilização do extrato de chicória	37
III.2.7. Influência da temperatura sobre o crescimento celular e a atividade enzimática	38
III.2.8. Influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ ), do pH e da concentração do íon fosfato sobre o crescimento celular e a atividade enzimática	38
III.2.9. Planejamento experimental	42
III.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS	42
III.3.1. Esquema de amostragem	42
III.3.2. Determinação da concentração celular	43
III.3.3. Determinação do consumo de substrato	44
III.3.3.1. Hidrólise ácida da inulina	44
III.3.3.2. Teste enzimático para determinação de glicose e frutose	45
III.3.4. Avaliação da presença de oligômeros de frutose	47
III.3.5. Medida da concentração de oxigênio dissolvido	48

III.3.5.1. Princípio de funcionamento do eletrodo	48
III.3.5.2. Procedimento de calibração do eletrodo	49
III.3.6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ )	49
III.3.7. Determinação da atividade enzimática	51
III.3.7.1. Hidrólise da inulina	51
III.3.7.2. Determinação da concentração de açúcares redutores (Método DNS)	51
III.3.8. Determinação das características da endo-inulinase	52
III.3.8.1. Estabilidade da enzima com o tempo de estocagem em diferentes temperaturas	52
III.3.8.2. Efeito da temperatura de incubação na atividade da enzima	53
III.3.8.3. Determinação da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) e da Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )	53
III.4. METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS	53
III.4.1. Concentração de glicose e frutose	53
III.4.2. Determinação da atividade enzimática	54
III.4.3. Concentração de inulina	54
III.4.4. Fatores de conversão	55
III.4.5. Produtividade	55
III.4.6. Atividade enzimática específica	56
III.4.7. Velocidade específica de crescimento	56
III.4.8. Velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) e Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para inulinase	56
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	58
IV.1. Seleção de fungos produtores de inulinas	58
IV.2. Seleção de fungos produtores de endo-inulinas	61
IV.3. Comparação entre o fungo selecionado e as linhagens bacterianas isoladas quanto à produção de endo-inulinas	63

IV.4. Otimização do teste de hidrólise enzimática da inulina	67
IV.5. Definição do meio de cultivo	68
IV.6. Substituição da inulina comercial por extrato de chicória	75
IV.7. Influência da temperatura sobre os parâmetros fermentativos	77
IV.8. Influência do $K_La$ , do pH e do íon fosfato na produção de endo-inulinase	80
IV.9. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	89
IV.10. Efeito do tempo de incubação na formação dos inulo-oligossacarídeos	90
IV.11. Estabilidade da enzima com o tempo em diferentes temperaturas de estocagem	90
IV.12. Determinação de $K_m$ e $V_{max}$	91
<b>V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	94
<b>APÊNDICE A - Curvas de Calibração</b>	97
<b>APÊNDICE B - Figuras</b>	101
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	104

## LISTA DE FIGURAS

II.1 - Esquema do processo enzimático de produção de fruto-oligossacarídeos a partir da sacarose.	6
II.2 - Preparo enzimático dos inulo-oligossacarídeos GF <sub>n</sub> e F <sub>n</sub> pela clivagem hidrolítica da inulina com endo-inulinase.	7
II.3 - Processo de produção de inulo-oligossacarídeos.	9
II.4 - Ações fisiológicas dos inulo-oligossacarídeos.	12
II.5 - Fórmula estrutural da molécula de inulina.	14
III.1 - Sistema de fermentação submersa em frascos Erlenmeyer, composto de duas partes: sistema de agitação Certomat U - B. Braun e incubadora Certomat HK - B. Braun.	34
III.2 - Esquema do sistema de fermentação em biorreator.	40
III.3 - Dispositivo experimental de fermentação.	40
III.4 - Representação esquemática do procedimento de amostragem.	43
III.5 - Redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico pelo açúcar redutor (AR), em meio alcalino.	51
IV.1 - Desenvolvimento micelial dos diversos fungos testados, após sete dias de incubação sobre inulina como fonte de carbono.	60
IV.2 - Evolução do pH do meio de cultivo em função do tempo de fermentação para as linhagens DSM 821, DSM 932, UFPE 3292 e DSM 2466.	61
IV.3 - Curva do consumo de substrato em função do tempo de cultivo para as linhagens DSM 821, DSM 932, UFPE 3292 e DSM 2466.	62
IV.4 - Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pelas linhagens DSM 821, DSM 932, UFPE 3292 e DSM 2466, após 144 horas de cultivo.	63
IV.5 - Evolução do pH do meio de cultivo das linhagens CDB 003, CDB 004, CDB 005 e DSM 2466 em função do tempo de fermentação.	64
IV.6 - Consumo de substrato (S), em função do tempo de cultivo, para as linhagens CDB 003, CDB 004, CDB 005 e DSM 2466.	65



IV.7 - Cromatoplasmas dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pelos diferentes microrganismos testados, após 96 horas de fermentação.	66
IV.8 - Células de <i>Paenibacillus</i> sp.	67
IV.9 - Cromatoplasma dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado (96 horas) pelo microrganismo CDB 003, em diferentes tempos, temperaturas e proporções enzima:substrato.	68
IV.10 - Consumo de substrato (S) em função do tempo de cultivo nos diferentes meios de cultivo testados (M1 a M8).	70
IV.11 - Cromatoplasma dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de fermentação dos diferentes meios de cultivo testados.	71
IV.12 - Gráfico dos efeitos principais das variáveis testadas (concentração de inulina, extrato de levedura, sulfato de amônio, ácido succínico e frequência de agitação) sobre a produção de enzima, após 48 horas de cultivo da cepa CDB 003.	73
IV.13 - Gráfico dos efeitos principais das variáveis testadas (concentração de inulina, extrato de levedura, sulfato de amônio, ácido succínico e frequência de agitação) sobre o consumo de substrato (S), após 48 horas de cultivo da cepa CDB 003.	74
IV.14 - Evolução do pH nos meios de cultivo contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC) em função do tempo de cultivo da cepa CDB 003.	75
IV.15 - Curvas de consumo de substrato (S) e crescimento celular (X) da cepa CDB 003 em função do tempo de cultivo, nos meios contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC).	76
IV.16 - Cromatoplasma dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado em 48 horas pela cepa CDB 003 nos meios contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC).	77
IV.17 - Curva de consumo de substrato (S), em função do tempo de cultivo da cepa CDB 003 para as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C.	78
IV.18 - Cromatoplasma dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de cultivo da cepa CDB 003 em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C).	78
IV.19 - Evolução do pH do meio de cultivo da cepa CDB 003 para as diferentes temperaturas testadas (30, 40, 50 e 60 °C).	79

IV.20 - Gráfico dos efeitos principais das variáveis testadas ( $K_{La}$ , pH e $PO_4^{=}$ ) sobre a atividade enzimática, após 48 horas de cultivo da cepa CDB 003.	81
IV.21A - Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pela cepa CDB 003 após diferentes tempos de cultivo - experimento 1.	82
IV.21B - Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pela cepa CDB 003 após diferentes tempos de cultivo - experimento 2.	83
IV.21C - Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pela cepa CDB 003 após diferentes tempos de cultivo - experimento 3.	83
IV.21D - Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pela cepa CDB 003 após diferentes tempos de cultivo - experimento 4.	84
IV.22 - Crescimento celular da cepa CDB 003 em função do tempo de cultivo para os experimentos 1 a 4.	84
IV.23 - Consumo de substrato em função do tempo de cultivo para os experimentos 1 a 4.	85
IV.24 - Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ), em função do tempo de cultivo, para o experimento 1.	85
IV.25 - Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ), em função do tempo de cultivo, para o experimento 2.	86
IV.26 - Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ), em função do tempo de cultivo, para o experimento 3.	86
IV.27 - Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ), em função do tempo de cultivo, para o experimento 4.	87
IV.28 - Atividade enzimática em função da temperatura de incubação da enzima.	89
IV.29 - Correlação entre o tempo de hidrólise da inulina e a concentração de açúcares redutores formados.	90
IV.30 - Velocidade da reação (V) em função da concentração de substrato (S).	92

IV.31 - Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) pelo método descrito por Lineweaver-Burk.	92
A.1 - Curva de correlação entre concentração celular (X) e a absorbância (abs) obtida a partir de suspensões de células do microrganismo CDB 003 cultivadas em meio IB: $X=(abs+0,0279)/0,165$ .	98
A.2 - Exemplo de uma curva de calibração obtida no teste de determinação de glicose e frutose em Sistema "Microtiter Reader": [Frutose] = $(abs-0,1428)/1,5369$ .	99
A.3 - Exemplo de uma curva de calibração obtida no teste de determinação de açúcares redutores pelo método DNS em espectrofotômetro Shimadzu: $[AR]=(abs+0,0012)/0,5239$ .	100
B.1 - Determinação de $\mu_{max}$ pelo método logarítmico para o experimento 1.	102
B.2 - Determinação de $\mu_{max}$ pelo método logarítmico para o experimento 2.	102
B.3 - Determinação de $\mu_{max}$ pelo método logarítmico para o experimento 3.	103
B.4 - Determinação de $\mu_{max}$ pelo método logarítmico para o experimento 4.	103

## LISTA DE TABELAS

II. 1 - Porcentagem de fruto-oligossacarídeos em algumas plantas comestíveis.	5
II.2 - Transformações químicas e microbianas da inulina e suas aplicações.	17
II.3 - Microrganismos, meios e condições de cultivo utilizados na produção de endo-inulinase.	28
III.1 - Microrganismos, meios de manutenção e temperatura de incubação dos microrganismos testados.	31
III.2 - Planejamento experimental utilizado para otimização do meio de cultivo e da frequência de agitação.	36
III.3 - Planejamento experimental utilizado para otimização das condições de cultivo.	41
III.4 - Procedimento de determinação das concentrações de glicose e frutose.	47
IV.1 - Estimativa do crescimento dos fungos testados, em presença de inulina, após dez dias de incubação.	58
IV.2 - Concentração celular final ( $X$ ), tempo de cultivo ( $t$ ) e produtividade em células ( $P_X$ ) para as linhagens CDB 003, CDB 004, CDB 005 e DSM 2466.	64
IV.3 - pH inicial e final dos diferentes meios de cultivo avaliados (M1 a M8).	69
IV.4 - Variáveis estudadas aos níveis + e - (concentração de inulina, extrato de levedura, sulfato de amônio, ácido succínico e frequência de agitação).	72
IV.5 - Plano experimental utilizado e resultados obtidos em termos de consumo de inulina e produção da enzima para os meios M1 a M8.	72
IV.6 - Valores dos efeitos principais e de interação entre as variáveis testadas, sobre o consumo de substrato e a produção de enzima, após 48 horas de fermentação.	73
IV.7 - Fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em células ( $P_X$ ) para os meios de cultivo contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC).	76
IV.8 - Valores de concentração celular inicial e final (96 horas) da linhagem CDB 003 em cultivo realizado em diferentes temperaturas.	79
IV.9 - Variáveis estudadas ( $K_{La}$ , pH e $PO_4^{=}$ ) aos níveis + e -.	80

IV.10 - Plano experimental utilizado e atividade enzimática observada em 48 horas de fermentação para os experimentos 1 a 4.	81
IV.11 - Valores dos efeitos principais das variáveis testadas, sobre a atividade enzimática.	81
IV.12 - Resultados gerais dos experimentos 1 a 4.	88
IV.13 - Valores de atividade enzimática obtidos para diversos tempos de incubação da enzima, em diferentes temperaturas de estocagem.	91
A.1 - Valores de absorbância de suspensões de células do microrganismo CDB 003 cultivadas em meio IB (espectrofotômetro LKB, 610 nm).	98
A.2 - Valores de absorbância de soluções padrão de frutose (espectrofotômetro "Microtiter Reader", 340 nm).	99
A.3 - Valores de absorbância de soluções padrão de frutose (espectrofotômetro Shimadzu, 540 nm).	100

## NOMENCLATURA

abs	absorbância
AE	atividade enzimática (U/mL)
AE <sub>esp</sub>	atividade enzimática específica (U/g célula)
AE <sub>max</sub>	atividade enzimática máxima
AR	açúcar redutor
BDA	meio batata-dextrose-ágar
C	concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L)
C*	concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)
Cz	meio Czapec
Da	Dalton
dC/dT	variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo
DCU	Unidade de Controle do Fermentador
DFA III	Di-frutose-dianidrido
DNS	Ácido dinitrossalicílico
DP	grau de polimerização
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
F	Frutose
F <sub>n</sub>	Fruto-oligossacarídeos
F <sub>2</sub>	Inulobiose
F <sub>3</sub>	Inulotriose
F <sub>4</sub>	Inulotetraose
F <sub>5</sub>	Inulopentose

FFT	Frutose:frutose frutossiltransferase
G	Glicose
GF	Sacarose
GF <sub>n</sub>	Glico-fruto-oligossacarídeo
GF <sub>2</sub>	1-Kestose
GF <sub>3</sub>	Nistose
GF <sub>4</sub>	Frutossil-nistose
HMF	Hidroximetil furfural
IB	meio para bactérias
IF	meio para fungos
IO <sub>s</sub>	Inulo-oligossacarídeos
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten (mM)
MEP	meio extrato de malte-peptona-ágar
P <sub>AE</sub>	produtividade em enzima (U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
P <sub>esp</sub>	produtividade específica (U.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
pO <sub>2</sub>	pressão parcial de oxigênio (%)
P <sub>x</sub>	produtividade em célula (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
S	concentração de substrato no tempo t (g/L)
S <sub>0</sub>	concentração inicial de substrato (g/L)
S <sub>f</sub>	concentração final de substrato (g/L)
SST	Sacarose:sacarose frutossiltransferase
t	tempo (h)
TLC	Thin Layer Chromatography

U	unidade de inulinase (1 $\mu\text{mol}$ de frutose por minuto de reação)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UHFGS	Ultra High Fructose Glucose Syrup
$V_{\text{max}}$	velocidade máxima de reação ( $\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto ( $\text{L.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
X	concentração celular ( $\text{g/L}$ )
$X'$	concentração celular correspondente à AE max ( $\text{g/L}$ )
$X_0$	concentração celular inicial ( $\text{g/L}$ )
$X_{\text{max}}$	concentração celular máxima ( $\text{g/L}$ )
$Y_{\text{P/S}}$	fator de conversão de substrato em produto (U de inulinase/g de produto)
$Y_{\text{X/S}}$	fator de conversão de substrato em célula (g de célula/g de substrato)
$\alpha, \beta$	percentagens da concentração de saturação em oxigênio no meio
$\mu_{\text{max}}$	velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )



## RESUMO

Tendo em vista que a hidrólise enzimática da inulina pela atuação de endo-inulinases pode produzir um xarope com elevado teor de inulo-oligossacarídeos, o presente trabalho teve como principais objetivos investigar o desempenho de microrganismos potencialmente produtores de endo-inulinases e estudar as condições de produção desta enzima.

Em uma primeira etapa, dezesseis linhagens fúngicas citadas na literatura como produtoras de endo-inulinases e três linhagens bacterianas parcialmente identificadas, isoladas de solo próximo à bulbos de dália, foram avaliadas quanto a produção de endo-inulinase. Os resultados indicaram o microrganismo isolado *Paenibacillus* sp. CDB 003 como sendo o melhor produtor de endo-inulinase. Este microrganismo foi, então, utilizado nas etapas seguintes deste trabalho.

Para avaliar as melhores condições para a hidrólise da inulina pelo caldo enzimático produzido pela cepa *Paenibacillus* sp. CDB 003, diferentes tempos (1; 2,5; 5; 8 e 24 horas), temperaturas (40, 50 e 60°C) e proporções de incubação substrato:enzima (1:2 e 1:5) foram testados. Os resultados demonstraram que a melhor produção de inulo-oligossacarídeos foi encontrada quando a hidrólise foi conduzida a 50°C, por 5 horas, na proporção substrato:enzima de 1:2.

Utilizando um planejamento fatorial fracionado, a influência das concentrações de inulina (1 e 0,5%), de extrato de levedura (0,25 e 0,05%), da concentração de sulfato de amônio (0,9 e 0,09%), de ácido succínico (0,1 e 0,01%), assim como da frequência de agitação (220 e 160 min<sup>-1</sup>) sobre a produção de endo-inulinase foi avaliada. Os melhores resultados foram obtidos quando o meio contendo 0,5% de inulina, 0,05% de extrato de levedura, 0,09% de sulfato de amônio e 0,1% de ácido succínico foi utilizado para o cultivo da cepa *Paenibacillus* sp. CDB 003, numa frequência de agitação de 160 min<sup>-1</sup>.

Sendo a inulina comercial um substrato de alto custo para a produção industrial de endo-inulinase, o comportamento da cepa *Paenibacillus* sp. CDB 003 foi investigado em meio contendo extrato de chicória como fonte natural de inulina. Os resultados encontrados foram similares àqueles obtidos com a inulina comercial.

*Paenibacillus* sp. CDB 003 foi cultivado em diferentes condições de temperatura (30, 40, 50 e 60°C) e o melhor crescimento e produção de enzima foram alcançados quando a temperatura de 50°C foi utilizada.

A influência do suprimento de oxigênio ( $K_La$  igual a 30 e 60 h<sup>-1</sup>), do pH do meio de cultivo (5.5 e 6.5) e da concentração do íon fosfato (0 e 4mM) sobre o crescimento celular e sobre a atividade inulinolítica também foi investigada em um planejamento fatorial fracionado. Os resultados mostraram que, nas faixas estudadas, somente o aumento do pH teve uma influência positiva sobre a produção de endo-inulinase, podendo as demais variáveis serem mantidas em seus níveis mais baixos ( $K_La$  igual a 30 min<sup>-1</sup> e ausência do íon PO<sub>4</sub><sup>-</sup>).

Finalmente, algumas características da enzima produzida pelo microrganismo *Paenibacillus* sp. CDB 003 foram investigadas. A temperatura ótima de atuação da enzima está próxima de 60°C. A enzima mostrou-se estável quando incubada em freezer (-18°C), geladeira (4°C) ou a temperatura ambiente, num período de 52 dias. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  encontrados para a enzima foram da ordem de 6,03 mM e 1,04 g.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectivamente. A correlação entre o tempo de hidrólise da inulina e a formação de açúcares redutores foi estudada. Os resultados mostraram haver proporcionalidade entre estas duas variáveis até 40 minutos de reação.

## ABSTRACT

Hydrolysis of inulin by endo-inulinases, yields a syrup with high content of inulo-oligosaccharides. Therefore, the main purposes of this work are to investigate the performance of microorganisms potentially producers of endo-inulinases and to study the production conditions of these enzymes.

In a first step, sixteen fungus strains reported in the literature as endo-inulinases producers and three bacterial strains, isolated from dahlia ryzosphere, were analyzed for endo-inulinase production. The results showed that the strain *Paenibacillus* sp. was the most suitable for endo-inulinase production.

Inulin was incubated with endo-inulinase produced by *Paenibacillus* sp. in different times (1; 2,5; 5; 8 and 24 hours), temperatures (40, 50 and 60°C) and substrate:enzyme proportions (1:2 and 1:5) and the best conditions for inulo-oligosaccharides production were 50°C, 5 hours in a 1:2 proportion.

A fractional factorial design was utilized to investigate the influence of the concentrations of inulin (1 and 0,5%), yeast extract (0,25 and 0,05%), ammonium sulfate (0,9 and 0,09%) and succinic acid (0,1 and 0,01%), as well as the agitation frequency (220 and 160 min<sup>-1</sup>), on the production of endo-inulinase. The best results were achieved when the medium containing 0,5% of inulin, 0,05% of yeast extract, 0,09% of ammonium sulfate and 0,1% of succinic acid was utilized for *Paenibacillus* sp. cultivation, in a 160 min<sup>-1</sup> agitation frequency.

Based on the high price of commercial inulin, the behavior of *Paenibacillus* sp. was investigated in culture medium containing chicory extract as a natural inulin source. The results showed similar production of endo-inulinase, in both cases.

*Paenibacillus* sp. was grown in different temperature conditions (30, 40, 50 and 60°C). Temperature of 50°C was the most suitable for endo-inulinase synthesis.

The influence of the initial oxygen transfer rate ( $K_{La}$  equal to 30 and 60 h<sup>-1</sup>), pH (5.5 and 6.5) and phosphate ion concentration (0 and 4 mM) on cell growth and on endo-inulinase activity were investigated in a fractional factorial design. In the studied range, only the increase of the pH of the culture medium had a positive influence on cell growth and endo-inulinase activity. The other variables can be maintained in their lowest levels ( $K_{La}$  equal to 30 h<sup>-1</sup> and absence of ion phosphate).

Finally, some enzyme kinetics properties were determined. The optimum temperature for enzyme action is around 60°C. The activity of the endo-inulinase from *Paenibacillus* sp. was maintained stable when stored in freezer (-18°C), in refrigerator (4°C) or at room temperature, for 52 days. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for the enzyme were found as being 6,03 mM and 1,04 g.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectively. The correlation between the time of inulin hydrolysis and formation of reducing sugars was verified. The results pointed to a linear correlation between these parameters until 40 minutes of reaction.

## I. INTRODUÇÃO

Em resposta à crescente demanda pelo consumo de alimentos naturais, saudáveis e de baixo teor calórico, um grande número dos chamados açúcares alternativos tais como a frutose, a palatinose e vários oligossacarídeos, incluindo isomalto-oligossacarídeos e fruto-oligosacarídeos têm emergido desde o início dos anos 80. Eles são importantes tanto pelas suas propriedades funcionais como pelo seu poder adoçante (YUN, 1996).

De todos os novos produtos introduzidos recentemente no mercado, os glico-fruto-oligossacarídeos (GF<sub>n</sub>) produzidos pela ação de enzimas microbianas, têm atraído especial atenção e são responsáveis pela expansão do mercado do açúcar por dois principais fatores. Primeiro, a produção em massa não é complicada (YUN, 1996). Segundo, o sabor é muito similar ao da sacarose, o mais tradicional dos açúcares, mas que apresenta limitações de uso por ser cariogênica e contra-indicada para pessoas portadoras de diabetes ou arteriosclerose (BORNET, 1994).

Em 1984, Meiji Seika Co., no Japão, desenvolveu o primeiro processo de produção comercial de fruto-oligossacarídeos. O produto, chamado Neosugar, é obtido a partir da ação da enzima frutotransferase de *Aspergillus niger* sobre a sacarose, rendendo uma mistura de 1-kestose, nistose e 1<sup>F</sup> frutofuranosil nistose. Neste processo de produção de glico-fruto-oligossacarídeos, o maior problema é a severa inibição da atividade da enzima pela glicose, que é gerada como subproduto. Como resultado, a maior parte dos produtos encontrados comercialmente, contém consideráveis concentrações de sacarose e glicose. O máximo teor de

glico-fruto-oligossacarídeos encontrado é de 55 a 60%, o que consequentemente limita o uso das favoráveis propriedades deste açúcar (YUN, 1996).

A busca por métodos econômicos de produção de oligômeros de frutose com maior grau de pureza envolve métodos enzimáticos para reduzir ou eliminar a glicose usando glicose-isomerase ou glicose-oxidase. Processos de separação por cromatografia de troca iônica também foram testados por Meiji Seika Co., mas os rendimentos eram muito baixos para serem aplicados na produção em escala comercial (YUN, 1996).

Uma alternativa viável para a produção de açúcares alternativos é o processo que envolve a hidrólise da inulina por enzimas chamadas endo-inulinases (VOGEL, 1993). A inulina é um polímero de frutose com uma unidade terminal de glicose, encontrada como carboidrato de reserva em diversas plantas como chicória, dália, alcachofra de Jerusalém, entre outras (VANDAMME & DERYCKE, 1983; RUMESSEM, 1992).

As endo-inulinases quebram a molécula de inulina em diferentes pontos da cadeia, em uma única etapa enzimática, produzindo inulo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização ( $GF_n$  e  $F_n$ ). A produção de inulo-oligossacarídeos a partir de inulina, utilizando endo-inulinases, proporciona um xarope de baixo teor em mono e dissacarídeos, dispensando a onerosa etapa da separação cromatográfica. Os inulo-oligossacarídeos são, na sua maioria, fruto-oligossacarídeos ( $F_n$ ), mas é esperado que estes compostos tenham aplicações similares às daquelas do Neosugar (VOGEL, 1993). A maior parte dos artigos encontrados, reportam a produção de uma mistura de exo e endo-inulinases por fungos filamentosos. Recentemente, maior atenção tem sido dada às endo-inulinases fúngicas e bacterianas (WANKER *et al*, 1995).

Este trabalho apresenta como objetivo, numa primeira etapa, uma avaliação de diferentes linhagens de fungos filamentosos, a fim de selecionar aquelas capazes de produzir endo-inulinases. Seguiu-se, então, uma comparação entre o desempenho do fungo selecionado e três linhagens bacterianas isoladas do solo próximo a bulbos de dália. O microrganismo selecionado foi então utilizado na etapa posterior do trabalho, que visou a otimização do meio e das condições de cultivo para a produção da enzima. Nesta etapa, foram realizados estudos dos seguintes parâmetros:

- influência da concentração de nutrientes;
- influência da frequência de agitação, temperatura, pH e suprimento de oxigênio;
- características cinéticas da enzima.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II. 1. INULO-OLIGOSSACARÍDEOS (oligômeros de frutose)

A sacarose tem sido, há séculos, o adoçante mais utilizado na área alimentícia. Consumidores estão tão habituados ao seu poder adoçante, que é desejado que qualquer substituto possua propriedades organolépticas e funcionais exatamente iguais às suas.

Embora a sacarose possua sabor, textura e poder adoçante definidos como “perfeitos” e um preço baixo e estável, a busca por adoçantes alternativos veio da necessidade de contornar seus efeitos indesejáveis tais como cariogênese, uso não aconselhável para diabéticos, contribuição para doenças do coração e alto valor energético, favorecendo a obesidade. Desta forma, o composto ideal para substituir a sacarose deve: ter baixo valor energético (não calórico), possuir propriedades físicas e químicas que precisamente se igualem às da sacarose em todas as aplicações em alimentos, prover benefícios à saúde como não ser cariogênico, ser utilizável por diabéticos e possuir o efeito das fibras, além de não conferir efeito colateral e ser tolerável ao consumo em qualquer quantia (BORNET, 1994).

Ultimamente, a indústria de alimentos tem desenvolvido um vasto número de açúcares alternativos de baixo teor calórico. A maior parte deles é permitida para aplicações em alimentos e é constituída de açúcares não digeríveis, como os oligossacarídeos.

No Japão, os oligossacarídeos têm sido extensivamente estudados após a descoberta das notáveis funções dos fruto-oligossacarídeos e de sua influência benéfica na saúde humana, pelo melhoramento da microflora intestinal (HIRAYAMA *et al.*, 1993). Este fato levou a um aumento da produção mundial de oligossacarídeos que, em 1996, alcançou 60 MM lb (TOMOMATSU, 1996).

### II. 1. 1. Ocorrência e distribuição

Os oligômeros de frutose são amplamente distribuídos na natureza. Podem ser encontrados em pinheiros, mel, cerveja, cebola, centeio, aspargo, cebolinha, alcachofra de Jerusalém, plantas gramíneas, banana, aveia, bardana, trigo etc.(MITSUOKA *et al.*, 1987).

A Tabela II. 1 mostra as porcentagens de fruto-oligossacarídeos encontradas em algumas plantas comestíveis.

**TABELA II. 1.** Porcentagem de fruto-oligossacarídeos em algumas plantas comestíveis

Plantas	Fruto-oligossacarídeos			Teor de	Açúcares
	[%]			umidade	totais
	matéria	matéria	em açúcares	[%]	[%]
	fresca	seca	totais		
Cebola	2,8	25,0	29,7	89,0	9,3
Cebola galesa	0,2	1,9	3,6	91,5	4,4
Alho	1,0	2,2	3,9	57,1	24,3
Bardana	3,6	16,7	22,0	78,5	16,4
Centeio	0,7	0,7	0,9	11,5	69,5
Banana	0,3	1,3	1,6	75,5	19,2

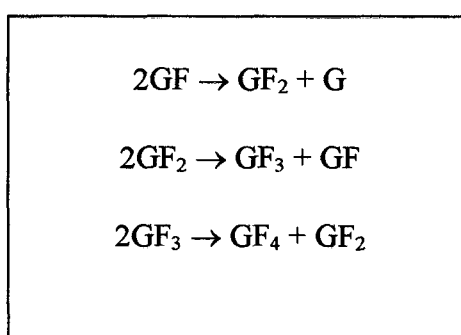
*Fonte:* MITSUOKA *et al.*, 1987.

### II. 1. 2. Produção

Dois processos para produção de misturas de oligômeros de frutose em larga escala são conhecidos. No primeiro processo, fruto-oligossacarídeos são sintetizados pela ação enzimática da frutossiltransferase sobre a sacarose. O produto deste processo, desenvolvido originalmente pela companhia Japonesa Meiji Seika Kaisha Ltd., tem o nome comercial “Neosugar” (HIDAKA, 1982) e consiste de uma mistura de glicose (G), sacarose (GF) e glico-fruto-oligossacarídeos (GF<sub>n</sub>) ligados na posição  $\beta$ -2,1, com uma unidade terminal de glicose. Neste caso, a enzima

frutossiltransferase, produzida por *Aspergillus niger*, transfere a parte frutósídica de uma molécula de sacarose doadora para uma molécula de sacarose receptora. Uma vez que as moléculas de 1-kestose ( $GF_2$ ) e nistose ( $GF_3$ ) formadas atuam como receptoras, o produto final contém 1-kestose, nistose e frutossil-nistose ( $GF_4$ ) (VOGEL, 1993).

A Figura II. 1 mostra, esquematicamente, o processo enzimático de produção de fruto-oligossacarídeos a partir da sacarose.



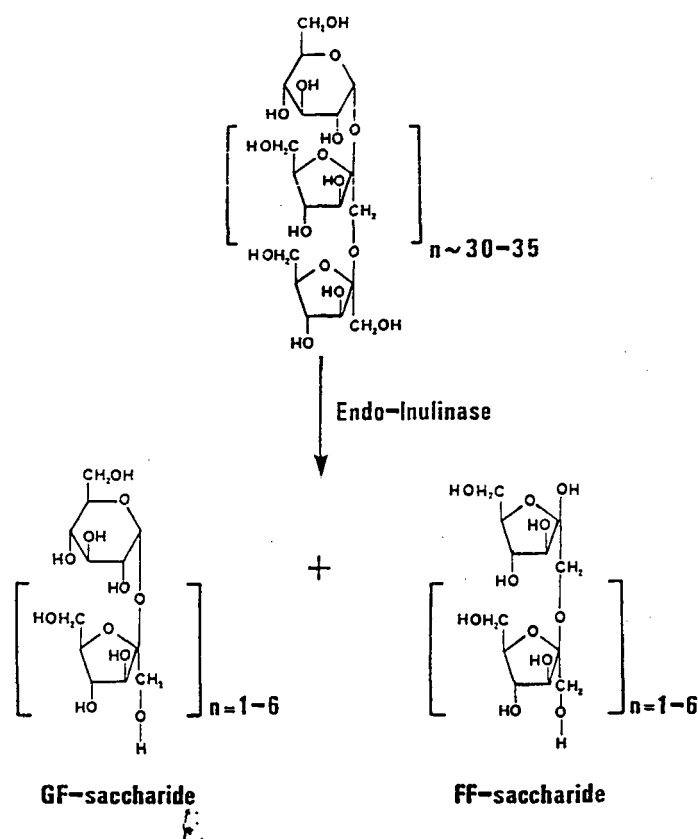
**FIGURA II. 1.** Esquema do processo enzimático de produção de fruto-oligossacarídeos a partir da sacarose.

Com este processo de produção de fruto-oligossacarídeos ( $FO_s$ ), obtém-se uma mistura que contém 35% de glicose e frutose, 10% de sacarose e 55% de FOs (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991). Os mono- e dissacarídeos encontrados na mistura constituem um problema na utilização das propriedades funcionais deste açúcar.

A busca por métodos econômicos de produção de oligômeros de frutose com maior grau de pureza envolve métodos enzimáticos para reduzir ou eliminar a glicose usando glicose-isomerase ou glicose-oxidase. Processos de separação por cromatografia de troca iônica também foram testados por Meiji Seika Co., mas os rendimentos eram muito baixos para serem aplicados na produção em escala comercial (JONG WON YUN, 1996).



Um outro processo para produção de oligômeros de frutose, que será descrito aqui com maiores detalhes, utiliza o polissacarídeo inulina ( $GF_n$ ). Neste caso, o polímero linear de frutose, unido por ligações  $\beta$ -2,1, contendo uma unidade terminal de glicose, é parcialmente hidrolisado pela enzima endo-inulinase. Como mostra a Figura II. 2, a hidrólise enzimática da inulina pela ação da endo-inulinase rende dois tipos de inulo-oligossacarídeos ( $IO_s$ ): hétero-oligômeros ( $GF_n$ ), idênticos àqueles do Neosugar e homo-oligômeros ( $F_n$ ), constituídos de moléculas de frutose unidas pela ligação  $\beta$ -2,1 mas desprovidos da unidade terminal de glicose (VOGEL, 1993).

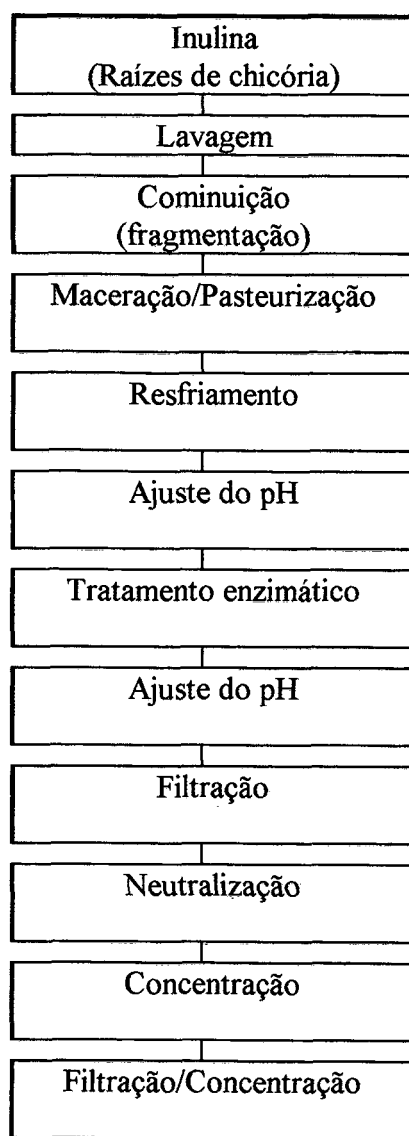


**FIGURA II. 2.** Preparo enzimático dos inulo-oligossacarídeos  $GF_n$  e  $F_n$  pela clivagem hidrolítica da inulina com endo-inulinase (VOGEL, 1993).

Este produto contém mais inulo-oligossacarídeos de cadeia longa (grau de polimerização variando entre 2 e 9) do que o Neosugar. O grau de polimerização (DP) destes IOs vai depender das características da enzima e do tempo de hidrólise utilizado. A quantidade de mono- e dissacarídeos, por outro lado, é baixa, apesar de inulobiose ( $F_2$ ), um componente de especial interesse, ser produzida paralelamente à sacarose. Este fato representa a principal vantagem da produção de inulo-oligossacarídeos a partir da hidrólise da inulina pela endo-inulinase. Inulotriose ( $F_3$ ) e inulotetraose ( $F_4$ ) são os principais produtos deste processo (DE-BRUYN *et al.*, 1992; YOKOTA, *et al.*, 1995; NORIINSHO/ NIPPON-DENPUN, 1987).

Ambos os produtos, Neosugar (obtido a partir da sacarose) e inulo-oligossacarídeos (obtidos a partir da inulina), têm as mesmas características. Além de serem produtos naturais, estes oligômeros de frutose possuem cerca de 0,4 a 0,6 vezes o poder adoçante da sacarose e podem ser considerados um tipo de fibra dietética solúvel, com um reduzido teor calórico (VOGEL, 1993).

Segundo VOGEL (1993), um dos processos para produção de inulo-oligossacarídeos (Figura II. 3) consiste da combinação entre tratamento enzimático com pasteurização e maceração, seguido de algumas etapas de purificação. Raízes de chicória são lavadas, picadas, maceradas, rapidamente aquecidas a 93-95°C e mantidas nesta temperatura por aproximadamente 15 minutos. A polpa resultante é pasteurizada para inativação de enzimas. Após a pasteurização, a polpa é resfriada a 56-58 °C, o pH é ajustado para 5.3-5.4 e a quantidade de endo-inulinase requerida é adicionada. Durante a incubação, o pH é continuamente monitorado e controlado pela adição de cal. A reação é interrompida após 16 horas pela elevação do pH para 10.5-11.0. O resíduo é descartado e o filtrado, contendo inulo-oligossacarídeos, é neutralizado, concentrado até 35 a 45% e filtrado novamente. Conforme o grau de pureza requerido para o produto final, algumas etapas alternativas de purificação ainda podem ser utilizadas.



**FIGURA II. 3.** Processo de produção de inulo-oligossacarídeos (VOGEL, 1993)

### **II. 1. 3. Características usuais e aplicações comerciais**

Os inulo-oligossacarídeos possuem propriedades físicas e fisiológicas que permitem uma ampla aplicação em alimentos tais como doces, bolachas, produtos achocolatados, produtos lácteos, fármacos etc. Como são sacarídeos não digeríveis, eles passam através do intestino delgado sem serem absorvidos e alcançam o intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias da microflora intestinal. Estas duas características são a chave para os benefícios dos inulo-oligossacarídeos à saúde humana: alívio da constipação intestinal, melhora da composição de lipídeos no sangue e supressão das substâncias putrefativas no intestino (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991). Além disso, os IOs não são cariogênicos, ou seja, eles não são utilizados por *Streptococcus mutans*, que produzem ácidos e  $\beta$ -glucanas insolúveis, principais responsáveis pelas cáries dentárias (YUN, 1996).

#### **II. 1. 3.1. Propriedades físicas e químicas**

Inulo-oligossacarídeos não possuem cor nem odor. Seu sabor é similar ao da sacarose, podendo ser utilizados como adoçante de alta qualidade, substituindo a sacarose sem alterar a textura ou a aparência do produto final (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991; RAFFINERIE TIRLEMONTOISE S.A., 1990). Dependendo do grau de polimerização obtido no processo de hidrólise, o poder adoçante dos IOs pode variar de 30 a 60% do poder adoçante da sacarose. Propriedades como a estabilidade com o pH, estabilidade com a temperatura, viscosidade, higroscopicidade etc, também são variáveis com o grau de polimerização. IOs com DP até 5 são estáveis em pH maior que 3 e temperaturas acima de 140°C (DREVON & BORNET, 1992).

#### **II.1. 3. 2. Não - digestibilidade**

Os IOs não são hidrolisados pelas enzimas digestivas, como as dissacaridases da mucosa intestinal e  $\alpha$ -amilases do pâncreas. Testes de tolerância deste açúcar em indivíduos saudáveis confirmaram que os IOs não são digeridos nem absorvidos pelo intestino delgado e que a sua ingestão não acarreta o aumento da concentração de glicose no plasma sanguíneo (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991), podendo ser utilizados por diabéticos.

Considerando que os oligômeros de frutose são componentes naturais de plantas, que não são hidrolisados pelas enzimas do trato digestivo humano, pode-se considerá-los como um tipo de fibra dietética, utilizável por pessoas obesas. Seu valor energético é limitado a certos produtos da fermentação no intestino grosso, como os ácidos graxos livres. Desta forma, pode-se assumir que o valor calórico dos oligômeros de frutose é de aproximadamente 1,5 kcal/g, representando cerca de 40% do valor energético da sacarose. Testes de tolerância realizados com pessoas saudáveis mostraram que o consumo deste açúcar pode chegar a 80 g diárias, sem efeitos colaterais indesejáveis (RAFFINERIE TIRLEMONTTOISE S.A., 1990).

### II.1. 3. 3. Utilização seletiva pelas bactérias do intestino

As bifidobactérias e os lactobacilos podem ser classificados como bactérias intestinais benéficas (WANG & GIBSON, 1993).

Estudos *in vitro*, utilizando bactérias isoladas, demonstraram que os IOs constituem um ótimo substrato para as *Bifidubacteria* spp. que possuem  $\beta$ -frutosidases (HIDAKA *et al.*, 1986; GIBSON & WANG, 1994). Da mesma forma, estudos *in vivo* em homens e animais demonstraram que a ingestão de IOs aumenta a colônia de bifidobactérias e lactobacilos (MITSUOKA *et al.*, 1987).

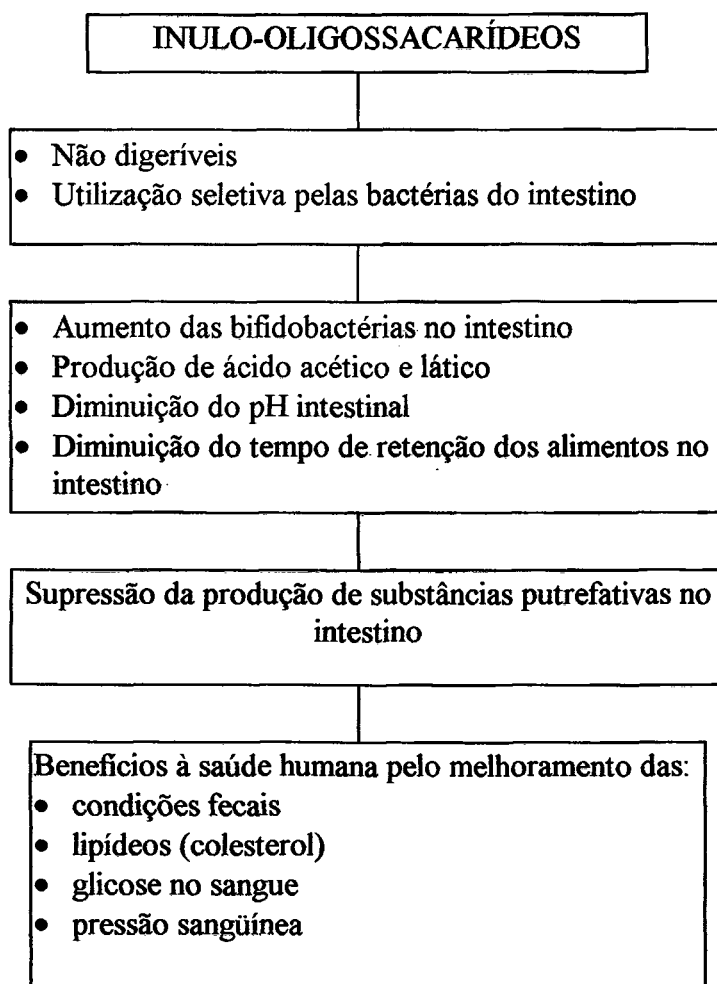
As bifidobactérias produzem ácido acético e ácido láctico que reduzem o pH intestinal, o que por sua vez regula as atividades metabólicas de outros microrganismos do intestino, restringindo ou impedindo o crescimento de muitas bactérias patogênicas e putrefativas como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringes*. Um número cada vez maior de dados indica que a redução do pH no intestino tem uma relação direta com a redução da carcinogênese do colo intestinal. Isto se dá através da redução da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias cocarcinogênicas, tais como os compostos N-nitrosos, produtos fenólicos da tirosina e do triptofano e metabólitos dos esteróides biliares (BORNET, 1994).

O aumento da microflora benéfica do intestino e a conseqüente supressão das substâncias putrefativas vêm acompanhados do alívio da constipação intestinal (HIDAKA *et al.*, 1986). Considera-se que o efeito do alívio do fenômeno constipativo, produzido quando da ingestão dos IOs, é devido ao aumento da pressão osmótica, causado pelos ácido graxos de cadeia curta que

são produzidos pelas bactérias do intestino, com consequente aumento do movimento peristáltico (HIRAYAMA *et al.*, 1993).

Estudos realizados com pacientes com alto grau de colesterol mostraram que a ingestão diária de inulo-oligossacarídeos reduziu a concentração de colesterol total devido à redução do nível do colesterol LDL (HIRAYAMA *et al.*, 1993).

A Figura II. 4 mostra as principais ações fisiológicas dos inulo-oligossacarídeos.



**FIGURA II. 4.** Ações fisiológicas dos inulo-oligossacarídeos (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991)

## II. 2. INULINA

### II.2.1. Propriedades

A inulina é um polímero de origem vegetal, que serve como carboidrato de reserva de várias plantas, particularmente de exemplares das famílias *Compositae* e *Gramineae*. Dentre estes, destacam-se a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.), a chicória (*Cichorium intybus* L.), a dália (*Dahlia pinnata* cav.), o dente de leão (*Taraxacum officinale*) (VANDAMME & DERYCKE, 1983; RUMESSEM, 1992) e o agave (*Agave azul tequilana*). A inulina encontrada em espécies como a dália, alcachofra de Jerusalém e chicória constitui aproximadamente 72 a 80% do peso seco destas plantas. Por razões de desempenho em termos de rendimento, somente a chicória (*Cichorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) são utilizadas como raízes com potencial para aplicação industrial (FUCHS, 1991). No momento, somente a chicória é utilizada para produção industrial da inulina na Bélgica, França e Holanda. O longo comprimento da cadeia e o rendimento constante, mesmo em condições de clima moderado, são as principais razões para esta escolha (LEENHEER & HOEBREGS, 1994).

Embora as inulinas sejam principalmente de origem vegetal, existem frutanas do tipo inulina de origem fúngica e bacteriana (FUCHS *et al.*, 1985). A inulina de origem vegetal, depois do amido, é o mais abundante polissacarídeo de reserva encontrado na natureza (LEENHEER & HOEBREGS, 1994).

A inulina é formada de resíduos de D-frutose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -2,1, com um resíduo terminal de glicose, o qual está ligado à frutose por uma ligação glicosídica  $\alpha$ -1,2 (RUMESSEM, 1992). A fórmula estrutural da inulina se encontra representada na Figura II.5.

Teoricamente, a inulina deve conter no mínimo 30 unidades de açúcar, podendo chegar até 50 unidades (RUMESSEM, 1992), enquanto que nas levanas (polímeros de frutose unidos por ligações  $\beta$ -2,6), o grau de polimerização pode exceder a 100.

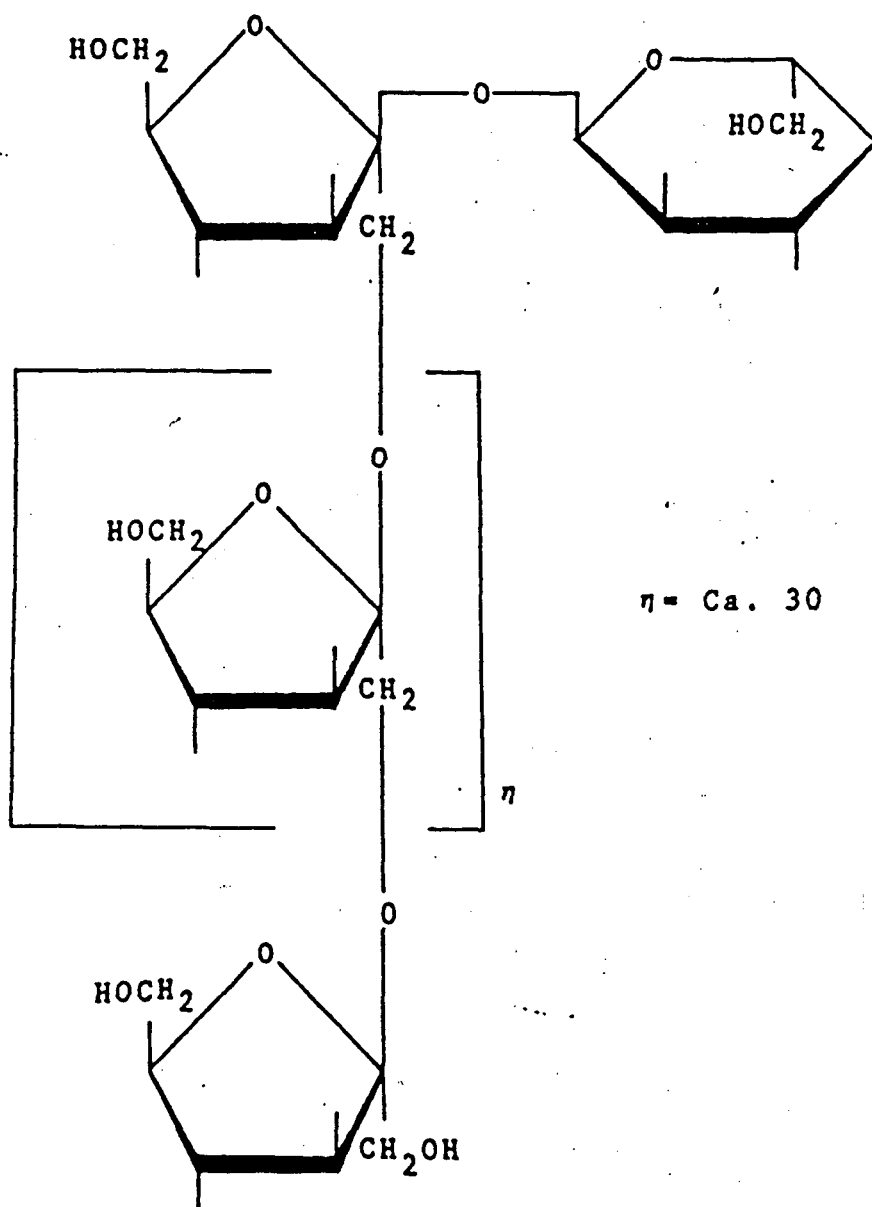


FIGURA II.5. Fórmula estrutural da molécula de inulina.



A biossíntese de frutanas em plantas é resultante da ação de duas enzimas: sacarose:sacarose frutossiltransferase (SST) e frutose:frutose frutossiltransferase (FFT), que atuam na fase de crescimento da planta (LIMAMI & FIALA, 1993), acumulando inulina em suas organelas de reserva. O comprimento médio da cadeia de inulina varia em função da planta e da estação do ano. Segundo BACON & LOXLEY (1952), citados por VANDAMME & DERYCKE (1983), durante a estocagem dos tubérculos de alcachofra de Jerusalém ou das raízes de chicória ou dente de leão, ocorre uma queda no grau de polimerização da inulina. O mesmo fenômeno foi observado por WHISTLER & SMART (1953) após estocagem de tubérculos de alcachofra de Jerusalém. Além disto, os autores verificaram que os tubérculos contém cerca de 65% (p/p) de inulina no verão, mas esta concentração começa a decrescer quando as folhas caem no outono, atingindo o valor de 55% no inverno. LEEENHEER & HOEBREGS (1994) explicam este fenômeno relatando que a inulina funciona como um osmoregulador. Devido à hidrólise parcial que ocorre na planta, o DP médio decresce, resultando numa maior pressão osmótica intracelular e num aumento da resistência ao frio. GUPTA *et al.* (1989) relataram que a concentração de frutose livre aumenta consideravelmente nas raízes de chicória colhidas no estágio de maturação, diminuindo o teor de inulina. Por outro lado, os autores afirmam que as raízes colhidas na época do pré-florescimento apresentam uma composição em inulina mais elevada. Este fenômeno é, provavelmente, resultado da ação da atividade inulinolítica da própria planta. Esta variação no grau de polimerização da inulina é um dos principais fatores envolvidos na produção industrial da inulina (LEENHEER & HOEBREGS, 1994).

Devido a esta grande variação no comprimento da cadeia, o peso molecular da inulina varia geralmente entre 3.500 e 5.500 Da (VANDAMME & DERYCKE, 1983), podendo alcançar 6.000 Da (ZITTAN, 1981; FUCHS *et al.*, 1985). Por outro lado, as inulinas produzidas por microrganismos têm maior peso molecular ( $\sim 2.10^7$  Da) (FUCHS *et al.*, 1985).

A inulina pura é praticamente insolúvel em água fria, mas pode ser facilmente dissolvida em água quente (55-60 °C). Apresenta insolubilidade em álcool anidro e é dificilmente solúvel em álcool diluído (MARCHETTI, 1993).

### II.2.2. Utilização industrial

Muitas aplicações interessantes para a inulina têm sido estudadas durante as últimas décadas. Entretanto, a degradação do polímero está envolvida na maioria delas.

No campo da Biotecnologia, a inulina é de grande interesse, uma vez que pode ser utilizada como um substrato relativamente abundante e barato para a produção microbológica de xarope de frutose (VANDAMME & DERYCKE, 1983), etanol (ROSA *et al.*, 1987) e aceto-butanol (MARCHAL *et al.*, 1985). Além disso, também pode ser utilizada como substrato para produção de inulo-oligossacarídeos de interesse clínico e nutricional (FUCHS, 1991).

Apesar da presença da inulina em numerosas mono e dicotiledôneas, poucas espécies contêm uma quantidade de frutanos que permite a utilização de uma técnica rentável de extração. Isto explica, em grande parte, porque os frutanos não são utilizados como matéria-prima em nível comparável ao amido. A inulina deve ser considerada, não apenas uma fonte potencial de frutose cristalina, de xarope com alto teor de frutose e inulo-oligossacarídeos, mas também um insumo em setores não-alimentícios (FUCHS, 1989; LALOUX, 1992).

A Tabela II.2 apresenta as três classes de transformação da molécula de inulina: transformação sem hidrólise prévia, com hidrólise parcial e com hidrólise total.

**TABELA II.2.** Transformações químicas e microbianas da inulina e suas aplicações.

Transformação		Produto/Aplicação
sem hidrólise	sem modificação	utilização médica ou alimentar
	conjugação	utilização médica
	ciclização	cicloinulo-oligossacarídeos
	derivatização/modificação	policarboxilatos
	hidrogenação	glicerol
com hidrólise parcial	hidrólise limitada	fruto-oligossacarídeos
com hidrólise total	fermentação microbiana	etanol e outros
	desidratação	hidroximetilfurfural
	desidratação/reidratação	ácido levulínico
	sem modificação	xarope de frutose

*Fonte:* FUCHS, 1991.

### II.2.2.1. Transformações sem hidrólise prévia

A inulina de alto peso molecular não pode ser metabolizada pelos animais sem hidrólise prévia, uma vez que estes não dispõem da enzima inulinase no organismo. Por mais de meio século, a inulina vem sendo utilizada em testes para diagnosticar a função renal. Atualmente, é utilizada, principalmente, no controle de qualidade de membranas de diálise em rins artificiais. A inulina começa também a ser utilizada como fibra de baixo teor calórico, sendo incorporada em alimentos como chocolate e *praliné* ou em cosméticos (FUCHS, 1991).

Drogas à base de inulina, conjugadas com o tropismo do trato urinário, têm sido utilizadas na cura de doenças urogenitais (FUCHS, 1989).

KAWAMURA & UCHIYAMA (1989) relataram a formação de cicloinulo-oligossacarídeos a partir de inulina, através de uma reação intramolecular de transfrutossilagem por uma enzima extracelular de *Bacillus circulans*. Os ciclo-inulossacarídeos podem ser utilizados como adoçante de baixo teor calórico, não-cariogênico e estimulante das bactérias entéricas (YOKOTA *et al.*, 1991).

Comparativamente ao amido, a inulina é sujeita a várias modificações e derivações. Sendo assim, a oxidação da inulina forma um policarboxilato apresentando a propriedade de complexar o cálcio, íon que poderá ser substituído pelo fosfato na química de produção dos detergentes (FUCHS, 1991).

Em 1967, VAN LING mostrou que a hidrogenação da inulina produzia glicerol, 1,2-propanodiol e glicol, que têm aplicação na indústria química.

#### **II.2.2.2. Transformações por hidrólise parcial**

Inulo-oligossacarídeos obtidos a partir da inulina, pela ação de endo-inulinases, com alto grau de pureza e grau de polimerização até 9, têm sido comercializados sob o nome de Raftilose, pela Raffinerie Tirlemontoise S.A. da Bélgica. Estes açúcares não são metabolizados, mas são seletivamente utilizados por bifidobactérias no intestino grosso. Estudos clínicos têm mostrado que a administração de fruto-oligossacarídeos contribui para a microflora intestinal, causando alívio da constipação, melhorando a composição lipídica do sangue e suprimindo a produção de substâncias putrefativas no intestino, tanto de animais como do homem (HIDAKA *et al.*, 1986).

#### **II.2.2.3. Transformações por hidrólise total**

Devido à degradação da inulina por numerosos microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), diferentes tipos de fermentação microbiana são conhecidos. Muitas das espécies de leveduras, não apenas hidrolisam inulina à frutose como também são capazes de fermentar o monômero à etanol (GUIRAUD *et al.*, 1981; DUVNJAK *et al.*, 1981). Por isso, nos últimos anos, o interesse pela produção de etanol a partir de inulina, usando estas espécies, aumentou consideravelmente (ECHEVERRIGARAY & TAVARES, 1985; BOURGI *et al.*, 1986). Segundo FUCHS (1989), com base nos dados de produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* e dados de

produção de alcachofra de Jerusalém e chicória, um potencial de produção de mais de 6.000 litros de etanol por hectare cultivado por ano, é possível. Isto significa que se a produção de etanol se tornar economicamente viável, estas culturas contendo inulina competirão com a maioria das culturas utilizadas industrialmente. Ácido glicônico e sorbitol foram simultaneamente produzidos a partir de glicose e inulina (alcachofra de Jerusalém) usando glicose-frutose oxidorreductase de *Zymomonas mobilis* e inulinase (KIM & KIM, 1992). Estes produtos encontram aplicação na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica.

Um dos produtos mais versáteis de conversão da frutose é o 5- hidroximetilfurfural (HMF), que se forma pela desidratação da inulina sob aquecimento ou da frutose em meio ácido. O HMF é um composto chave da química dos furanos e apresenta, assim como seus derivados, um potencial interessante na indústria de detergentes e de cristal líquido (FUCHS, 1989).

Por subsequente reidratação do HMF, forma-se ácido levulínico, que também pode ser transformado, entre outros compostos, em poliésteres e poliamidas (FUCHS, 1989).

Devido à presença de uma única molécula de glicose na cadeia de inulina, a hidrólise completa produz um xarope com até 95% de frutose (KIM & RHEE, 1989). Este fato poderá permitir a fabricação do xarope de frutose a partir de inulina, em concorrência com a produção de xarope com alto teor de frutose (UHFGS - "Ultra High Fructose-Glucose Sirup") a partir do amido. Uma desvantagem da hidrólise química da inulina é o aparecimento de difrutose dianidrido (subproduto indesejável) com formação de cor e odor, justificando, portanto, a utilização da hidrólise enzimática pelas inulinases microbianas (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

### II. 3. INULINASES

Enzimas que degradam a inulina são classificadas como inulinases (2,1  $\beta$ -D-fruto-frutanohidrolases - EC 3.2.1.7).

Como toda enzima hidrolítica, de acordo com o seu modo de ação, as inulinases podem ser classificadas como endo-inulinases ou exo-inulinases (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

As exo-inulinases quebram as ligações  $\beta$ -2,1 da inulina a partir do terminal não redutor da cadeia, liberando frutose como único produto da reação (GUIRAUD & GALZY, 1989). As endo-

inulinases quebram as ligações  $\beta$ -2,1 internas da inulina em diferentes pontos da cadeia, produzindo oligômeros de frutose (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

As inulinases podem ser originadas de plantas ou microrganismos (SNYDER & PHAFF, 1960; VANDAMME & DERYCKE, 1983). As primeiras inulinases estudadas eram originadas de plantas que continham inulina, mas poucas referências sobre estas enzimas são encontradas (BARATTI & ETTALIBI, 1993). GUPTA *et al.* (1993), observaram que 75% da inulinase encontrada em raízes de chicória estão firmemente ligadas à parede celular. No entanto, a quantidade de enzima encontrada dessa forma é muito pequena para ser utilizada com propósitos comerciais. Mais tarde, inulinases microbianas, originadas de fungos, leveduras e bactérias, foram isoladas e estudadas (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Algumas exo-inulinases (2,1  $\beta$ -D-fruto-frutanohidrolases - EC 3.2.1.7) microbianas apresentam atividade sobre a sacarose, assemelhando-se às invertases (ROUWENHORST, 1990). Estas não apresentam ou apresentam fraca atividade sobre a inulina (SNYDER & PHAFF, 1960; GROOTWASSINK & HEWITT, 1983; FUCHS *et al.*, 1985). As endo-inulinases, por sua vez, têm pequena ação sobre a sacarose (NORMAN & HOJER-PETERSEN, 1989), podendo ser, desta forma, diferenciadas das inulinases com ação exo.

Outro tipo de inulinase, denominada Inulinase II (EC 2.4.1.93) também é reportada por alguns autores. Esta enzima converte a inulina em ciclo inulo-oligossacarídeos como a di-D-frutose 2',1:2, 3' dianidrido (DFA III) e uma pequena parcela de oligômeros, através de uma reação de transfrutolização intramolecular (UCHIYAMA *et al.*, 1973; YOKOTA *et al.*, 1991; KAWAMURA *et al.*, 1988).

## **II. 3. 1. Características das endo-inulinases**

### **II. 3. 1. 1. Endo-Inulinases fúngicas**

*Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* (HOK-1, FERM P-8705) e *Penicillium trzebinkii* (HOK-2, FERM P-8706) diferem de outras linhagens fúngicas reportadas, que na sua maioria produzem uma mistura de exo e endo-inulinase. Estes microrganismos produzem

somente uma endo-inulinase termoestável, que mostra atividade ótima à 55-58°C e pH ótimo numa faixa que varia de 4.0 a 5.5 (MITSUI-TOATSU, 1987).

ONODERA E SHIOMI (1988) também purificaram uma endo-inulinase produzida por *Penicillium purpurogenum* e examinaram o efeito do pH na atividade da enzima. O valor de pH ótimo encontrado foi igual a 5.1. A enzima mostrou-se estável em valores de pH variando de 5.0 a 7.5 e temperatura de 55 °C. Os valores da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e de velocidade máxima de hidrólise da inulina ( $V_{max}$ ) encontrados para a enzima foram de 0,21 mM e 100 mM/min respectivamente. Os parâmetros cinéticos referentes à hidrólise de fruto-oligossacarídeos ( $GF_n$ ,  $n=2$  a 9) também foram calculados, aumentando conforme o aumento do grau de polimerização (DP 3 a 7) e permanecendo constantes para polímeros com DP acima de 7, sugerindo que a endo-inulinase de *Penicillium purpurogenum* tem uma estrutura que consiste de pelo menos sete sítios ativos.

Os mesmos autores estudaram uma endo-inulinase produzida por *Penicillium trzebinskii*, encontrando uma enzima de peso molecular igual a 87.000 Da, ponto isoelétrico igual a 4.3 e pH ótimo igual a 5.2. A enzima mostrou-se estável em pH variando de 4.0 a 9.0 e em temperaturas acima de 50°C (ONODERA E SHIOMI, 1992).

Segundo XIAO *et al.* (1989), *Chrysosporium panorum* AHU 9700, isolado do solo, produz uma endo-inulinase de ponto isoelétrico em torno de pH igual a 3.8. A enzima é uma glicoproteína de peso molecular igual a 58.000 Da (determinado por SDS-PAGE). O pH ótimo para atividade da enzima encontra-se entre 6.0-7.0 (50 °C) sendo estável em pH 4.5-8.5 (30 °C, 24 horas). A temperatura ótima de atuação da enzima é de 50 °C, sendo estável a 45 °C por 10 minutos. À 50 °C, a enzima perde 15% de sua atividade e a 60 °C perde completamente sua atividade, quando incubada por 30 minutos.

Uma inulinase extra-celular de *Aspergillus niger* foi purificada por NAKAMURA *et al.* (1978). Os principais produtos obtidos da hidrólise da inulina foram inulotriose, inulotetraose e inulopentaose. A enzima possuía pouca atividade sobre inulo-oligossacarídeos menores do que pentassacarídeos e mostrou atividade máxima em pH 5.3 e 45 °C. O valor de  $K_m$  para a inulina foi de 1,25 mM.

Duas endo-inulinases produzidas por um microrganismo mutante (*Aspergillus niger* 817) foram reportadas por NAKAMURA *et al.* (1994). As enzimas eram ativas somente sobre inulina, rendendo inulotriose e inulotetraose como principais produtos de hidrólise. Os valores de  $K_m$  encontrados foram de 0,48 e 0,50 mM para as duas enzimas.

O extrato enzimático produzido por *Aspergillus ficuum* foi parcialmente caracterizado e purificado por NORMAN E HOJER-PEDERSEN (1989) e mostrou conter pelo menos três principais enzimas: exo-inulinase, endo-inulinase e frutossiltransferase. A fração endo possuía pH e temperatura ótimos iguais a 5.0 e 55-60 °C, respectivamente e convertia inulina principalmente em inulotriose e inulotetraose. A combinação da endo inulinase e da exo-inulinase presentes no extrato, mostrou ser um eficiente sistema para produção de frutose, indicando um efeito de sinergismo.

AZHARI *et al.* (1989) descreveram o isolamento de duas inulinases obtidas a partir de um extrato enzimático comercial (NovoZym 230) também produzido por *Aspergillus ficuum*. As duas inulinases possuíam modo de ação distinto, atuando de forma exo ou endo sobre a inulina. A presença de duas ou mais enzimas na mistura indica um efeito de sinergismo. A ação da endo-enzima causa um contínuo decréscimo na concentração de seu próprio substrato (ligações glicosídicas) e um concomitante aumento na concentração de substrato para a exo-enzima. Por outro lado, a atividade da exo-inulinase não possui efeito na concentração do seu próprio substrato, enquanto diminui a concentração de substrato para a endo-inulinase. A taxa inicial de degradação da inulina para a endo inulinase foi plotada de acordo com Lineweaver-Burk. Os resultados de  $K_m$  e  $V_{max}$ , calculados, em termos de ligações glicosídicas, foram 570 mM e 8,3 mM/min respectivamente.

### II. 3. 1. 2. Endo-Inulinases bacterianas

Embora alguns autores reportem a produção de endo-inulinases por bactérias (MITSUBISHI-CHEM, 1990; YOKOTA *et al.*, 1995; MÜLLER & STELLER, 1995), apenas as características da enzima produzida por *Bacillus sp* (KK-4645) foram parcialmente estudadas. Esta enzima decompõe a inulina produzindo vários tipos de inulo-oligossacarídeos. O microrganismo foi cultivado em um meio contendo 1% de inulina, 3% de NZ amina, 0,2% de



cloreto de amônio e 0,05 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a 30°C, por 3 dias, produzindo uma endo-inulinase estável em pH 5.5-7.0, encontrando condições ótimas para a atividade enzimática em pH igual a 7.0 e temperatura de 40°C (NORIINSHO/NIPPON-DENPUN, 1987).

### III. 3. 2. Ação da endo-inulinase sobre a inulina

A ação das endo-inulinases sobre a inulina tem sido estudada por alguns autores, mostrando que, no estágio inicial da reação, esta enzima hidrolisa a inulina em inulo-oligossacarídeos com vários graus de polimerização, formando inulotriose e inulotetraose como principal produto final.

ONODERA & SHIOMI (1988), estudando a ação da endo-inulinase de *P. purpurogenum* sobre a inulina, a 37 °C, observaram que na fase inicial de reação, a inulina foi rapidamente degradada e após 12 horas de reação, 32,3% deste substrato havia sido degradado. Os principais produtos da reação foram identificados como tri-, tetra-, penta- e hexassacarídeos.

Em outro trabalho, a adição de 3 U/g de uma endo-inulinase produzida por *P. purpurogenum* a uma solução de inulina a 20%, resultou, após 48 horas de incubação a 60 °C, numa solução contendo oligômeros nas seguintes proporções: 15% de DP1, 3,3% de DP2, 31,4% de DP3, 26,6% de DP4, 20,4% de DP5, 13,3% de DP6 e 3,5% de oligômeros com DP maior que 6 (MITSUI-TOATSU-CHEM, 1994).

Conforme relatado na patente japonesa da NORIINSHO/NIPPON-DENPUN (1987), células da bactéria *Bacillus* sp. KK-4645 foram coletadas do meio de cultivo e ressuspensas em 5 mL de tampão. Foi adicionado 1 mL desta suspensão de células a 10 mL de uma solução de inulina a 5%. A mistura foi incubada a 30 °C, por 15 horas, após as quais 56% da inulina foi convertida em oligossacarídeos (7% de inulobiose, 27% de inulotriose, 47% de inulotetraose, 14% de inulopentose e 5% de inulohexaose).

Por outro lado, XIAO *et al.*, (1989) ao avaliarem a hidrólise da inulina por uma endo-inulinase produzida por *Chrysosporium panorum*, observaram que, após 15 minutos de reação, apenas inulotriose, inulotetraose e inulopentose foram formados como principais produtos da reação.

YOKOTA e seus colaboradores (1995) estudaram a produção de inulotriose a partir de inulina por uma enzima obtida de *Streptomyces rochei* E87. A enzima foi adicionada a soluções de inulina de diversas concentrações (10, 20, 50 e 100 g/L) e incubada a 40 °C. No estágio inicial da reação, inulotetraose foi formada como principal produto. Entretanto, após 24 horas, a concentração de inulotetraose decresceu, dando lugar a inulotriose como principal produto (aproximadamente 70% para todas as concentrações de inulina utilizadas).

O modo de ação da endo-inulinase de *Aspergillus ficuum* também foi estudado incubando-se inulina a 20% (p/p) a 60 °C, em pH 4.5, com o extrato enzimático. Inicialmente, observou-se a formação de uma série de oligossacarídeos, predominando DP3 e DP4. O efeito do tempo de reação na produção de inulo-oligossacarídeos, utilizando-se uma concentração de 0,5 INU/g da enzima, mostrou que a produção máxima de DP 3 e DP4 foi obtida em 24-48 horas. Aumentando-se a concentração da enzima ou o tempo de reação, estes inulo-oligossacarídeos eram gradualmente hidrolisados a frutose (NORMAN & HOJER-PEDERSEN, 1989).

## II. 4. PRODUÇÃO DE INULINASES POR MICRORGANISMOS

### II. 4. 1. Microrganismos produtores

#### II.4.1. 1. Leveduras

Segundo BARNETT *et al.*, 1983, citados por ROUWENHORST (1990), das 469 espécies de leveduras descritas, apenas dez espécies, divididas em 7 gêneros (*Debaromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Schizosaccharomyces*), são capazes de metabolizar a inulina. Ao contrário das bactérias e dos fungos filamentosos, as leveduras parecem ter um padrão enzimático muito restrito, uma vez que todas as enzimas de leveduras, até então examinadas, são exofrutanases com atividade tanto de inulinase quanto de levansase (enzima que degrada um polímero constituído de monômeros de frutose unidos por ligações  $\beta$ -2,6 (FUCHS *et al.*, 1985).

Dentre as leveduras produtoras de exo-inulinases, as do gênero *Kluyveromyces* têm apresentado bom desempenho. A levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi selecionada por PASSADOR-GURGEL *et al.* (1996) em estudos nos quais foram avaliadas espécies pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Schizosaccharomyces*. Além deste microrganismo ter apresentado bom desempenho global dentre os critérios estudados, outras características pertencentes a este gênero também influenciaram na sua escolha. As condições de cultivo deste microrganismo para a produção de exo-inulinase a partir de inulina foram posteriormente determinadas por SCHNEIDER (1996). Além destes, inúmeros trabalhos são reportados na literatura científica com relação à produção de exo-inulinase por leveduras (ROUWENHORST, 1990; PAREKH & MARGARITIS, 1986).

#### II. 4. 1. 2. Fungos filamentosos

Dentre os fungos, lista-se um grande número de espécies capazes de produzir inulinase. No entanto, neste caso, as enzimas produzidas podem ser exofrutanases e/ou endofrutanases. As inulinases de *Aspergillus niger*, por exemplo, formam predominantemente inulotriose, inulotetrose e inulopentose e, praticamente, não apresentam ação hidrolítica sobre pequenos oligômeros (VANDAMME & DERYCKE, 1983). *Aspergillus* (NAKAMURA *et al.*, 1978; ETTALIBI & BARATTI, 1990; CARNITI *et al.*, 1991), *Penicillium* (VANDAMME & DERYCKE, 1983), *Fusarium* (GUPTA *et al.*, 1988; KAUR *et al.*, 1992) e *Rhizopus* (VANDAMME & DERYCKE, 1983) são alguns exemplos de fungos capazes de produzir inulinase.

Fungos do gênero *Aspergillus* são os mais estudados quanto a produção de endo-inulinases.

*Aspergillus ficuum* produz uma enzima termotolerante utilizada na produção de um extrato enzimático comercial contendo exo e endo-inulinases (ZITTAN, 1981; CARNITI, *et al.*, 1991; NORMAN & HOJER-PEDERSEN, 1989; AZHARI *et al.*, 1989). ETTALIBI & BARATTI (1987) purificando este extrato comercial (NovoZym 230), encontraram nove  $\beta$ -frutofuranosidases (uma invertase, cinco exo-inulinases e três endo-inulinases), todas glicoproteínas com um alto teor de açúcar (22 a 41 % p/p).

Endo-inulinasas produzidas por *Aspergillus niger* também foram reportadas por NAKAMUARA *et al.* (1978), UHM *et al.* (1987) e NAKAMURA *et al.* (1994) e vários processos patenteados, envolvendo a produção de inulo-oligossacarídeos por este microrganismo também foram desenvolvidos (MITSUI-TOATSU CHEM, 1991; MELI SEIKA KAISHA-CHEM, 1987).

*Chrysosporium panorum* (XIAO *et al.*, 1989), *Fusarium oxysporum* (KAUR *et al.*, 1992) e *Penicillium purpurogenum* e *P. trzebinskii* (ONODERA & SHIOMI, 1988, 1992) também são microrganismos conhecidos por produzirem exo e endo-inulinasas.

#### 4. 1. 3. Bactérias

Muitos autores reportaram a degradação da inulina pela ação de exo-inulinasas produzidas por bactérias tais como *Bacillus subtilis* (KUNST *et al.*, 1977; ALLAIS *et al.*, 1987; VULLO *et al.* 1991; BELAMRI *et al.*, 1994; WANKER *et al.*, 1995), *Actinomyces viscosus* (MILLER & SOMERS, 1978), *Bifidobacterium* sp (MCKELLAR *et al.*, 1993; MURAMATSU *et al.*, 1994), *Arthrobacter* sp (HARAGUCHI *et al.*, 1990; ELYACHIOUI *et al.*, 1992), *Clostridium* sp (EFSTATHIOU *et al.*, 1986; DRENT, *et al.*, 1991) e *Flavobacterium multivorum* (ALLAIS *et al.*, 1986). A maioria destas inulinasas bacterianas são intra-celulares, o que requer um tratamento preliminar da célula, limitando seu uso industrial (ELYACHIOUI *et al.*, 1992).

Bactérias produtoras de um tipo de inulinase denominada inulina-frutotransferase, que degrada a inulina através de uma reação de transfrutozilação intramolecular, produzindo inulo-oligossacarídeos cíclicos, têm sido também estudadas por vários grupos de pesquisa. A enzima tem sido encontrada em microrganismos tais como *Arthrobacter ureafaciens* (UCHIAMA, 1975), *Arthrobacter globiformes* (SEKI *et al.*, 1988), *A. ilicis* (KAWAMURA *et al.*, 1988) e *Bacillus circulans* (KAWAMURA & UCHIAMA, 1989; MITSUBISHI-CHEM, 1995).

A despeito dos inúmeros relatos sobre bactérias produtoras de exo-inulinasas e inulina-frutotransferase, até o presente momento, poucas referências foram encontradas sobre endo-inulinasas bacterianas.

MÜLLER & STELLER (1995), estudando a degradação da inulina por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, concluíram que as enzimas degradativas

provenientes destes microrganismos podem variar seu modo de ação, atuando como exo e endo-hidrolases.

A bactéria *Streptomyces sp.* MCI-2423, produz uma enzima que hidrolisa frutanas pela remoção de três a quatro unidades de açúcar, a partir da molécula terminal de frutose da cadeia, produzindo inulotriose e/ou inulotetraose (MITSUBISHI-CHEM, 1990).

#### **II. 4. 2. Fatores que afetam o crescimento microbiano e a atividade enzimática**

A influência da temperatura, do pH, dos constituintes do meio de cultivo e do suprimento de oxigênio no crescimento microbiano e/ou na síntese de exo-inulinases produzidas por fungos filamentosos e leveduras vem sendo objeto de estudo de vários grupos de pesquisa (GROOTWASSINK & FLEMING, 1980; SNYDER & PHAFF, 1960; GUPTA *et al.*, 1990; PESSOA JR *et al.*, 1995). No entanto, poucas são as referências encontradas sobre a influência destes fatores na produção de endo-inulinases.

A maioria dos trabalhos envolvendo endo-inulinases, relatam sua purificação e caracterização, citando as condições de cultivo utilizadas, mas não apresentando estudos sobre este fator.

Inúmeros meios de cultivo, valores de pHs e temperatura para produção de inulinases têm sido reportados, mas a definição destes fatores depende do tipo de microrganismo envolvido.

A composição dos meios de cultivo é um fator fundamental para a produção de inulinase por microrganismos. Isto implica na presença dos nutrientes adequados tais como, nitrogênio, vitaminas e sais, bem como da fonte de carbono no meio de cultivo. Segundo alguns autores (SNYDER & PHAFF, 1960; VANDAMME & DERYCKE, 1983; PAREKH & MARGARITIS, 1986), a presença de inulina como fonte de carbono é, praticamente, um pré requisito para formação de inulinase. YOKOTA *et al.* (1995), estudando a produção de endo-inulinase por *Streptomyces rochei* E87, avaliaram o efeito da substituição da inulina por outras fontes de carbono tais como ácido acético, celobiose, celulose, rafinose, amido, sacarose e xilanose. Os resultados mostraram que a enzima era induzida pela inulina. O fungo *Chrysosporium pannorum* foi também cultivado em diferentes fontes de carbono e avaliou-se o efeito destes açúcares na produção de inulinase. A inulinase foi encontrada apenas no meio contendo inulina, sugerindo que, para este

microrganismo, esta é uma enzima induzida (XIAO *et al.*, 1988). KIM (1975 a,b), citado por VANDAMME & DERYCKE (1983), observou que a adição de outros açúcares não tem efeito na formação de inulinase por *Penicillium* spp. Além disto, um estudo realizado por GUPTA *et al.* (1990), com o fungo *Fusarium oxysporum*, revelou que a adição de diferentes açúcares, após três dias de cultivo, em meio contendo inulina, diminui a atividade em inulinase. Por outro lado, *Aspergillus niger* Mutant 817 produz duas formas de endo-inulinase altamente ativas em culturas contendo sacarose como fonte de carbono (NAKAMURA *et al.*, 1994).

Quanto ao suprimento de oxigênio, este parece ser essencial para a produção de endo-inulinase, pois nenhum relato foi encontrado sobre a produção desta enzima, em condições de anaerobiose.

A Tabela II.3 apresenta alguns valores de temperatura, pH e a composição de meios de cultivo utilizados na produção de endo-inulinas por diferentes microrganismos.

**TABELA II.3.** Microrganismos, meios e condições de cultivo utilizados na produção de endo-inulinase.

<b>Microrganismo</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Meio de Cultivo (g/L)</b>	<b>Referência</b>
<i>Streptomyces rochei</i> E87	7.0	32	inulina (30), extrato de levedura (10), extrato de carne (1), CaCO <sub>3</sub> (20), NaNO <sub>3</sub> (2), MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,5), KCl (0,5), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5), FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,05)	YOKOTA <i>et al.</i> (1995)
<i>Penicillium purpurogenum</i>			inulina (20 a 40), maltose, sulfato de amônio	MITSUI TOATSU CHEM (1991).
<i>Penicillium purpurogenum</i>	7.0	28	inulina (20), maltose (5), NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (5), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (5), MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,5), Tween 80 (0,2)	ONODERA & SHIOMI (1988)

<i>Streptomyces</i> sp.MCI-2423		30	inulina (15), NaNO <sub>3</sub> (2), MgSO <sub>4</sub> (0,5), KCl (0,5), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5), extrato de levedura (0,2), traços de cloreto férrico.	MITSUBISHI CHEM (1990).
<i>Chrysosporium</i> <i>panorum</i> AHU 9700	5.0	27	inulina (10), extrato de carne (10), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,3), MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,5), FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,01)	XIAO <i>et al.</i> (1989)
<i>Bacillus</i> sp. KK- 4645		30	inulina (10), NZ amina (30), cloreto de amônio (2), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5)	NORIINSHO; NIPPON- DENPUN (1987)
<i>A. niger</i> 817		30	sacarose (30)	NAKAMURA <i>et al.</i> (1994)
<i>A. niger</i> M(T) 114		28	100 g de grãos de cevada triturados em uma solução contendo: glicose (5), lactose (10), extrato de carne (5), sulfato de amônio (1), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1), KCl (0,5), MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,5), FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,01)	MEIJI SEIKA KAISHA LTD. (1987).
<i>A. niger</i> M79		30	DERYCKE & VANDAMME (1984) com milhocina (20) em substituição ao extrato de levedura	UHM <i>et al.</i> (1987)

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. MICRORGANISMO

Dezesseis linhagens de fungos filamentosos citados na literatura como produtores de inulinase, obtidas da DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) e do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e três linhagens bacterianas isoladas do solo próximo a bulbos de dália, nos laboratórios do CDB (Centro de Desenvolvimento Biotecnológico), foram utilizadas na realização deste trabalho. Os bulbos de dália foram escolhidos, por ser esta espécie de planta conhecida por possuir inulina (72 a 80% do peso seco) e facilmente encontrada na região de Joinville. Os nomes e os respectivos códigos dos microrganismos estão listados a seguir:

<i>Aspergillus niger</i> - DSM 821	<i>Cladosporium cladosporioides</i> - UFPE 2830
<i>Aspergillus niger</i> - DSM 2466	<i>Penicillium purpurogenum</i> - UFPE 2705
<i>Aspergillus ficcum</i> - DSM 2466	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - UFPE 806
<i>Aureobasidium pullulans</i> - DSM 3042	<i>Aureobasidium pullulans</i> - UFPE 2837
<i>Penicillium purpurogenum</i> - DSM 62866	<i>Pennicilium rugulosum</i> - UFPE 1864
<i>Chrysosporium pannorum</i> - DSM 62116	<i>Aspergillus niger</i> - UFPE 3292
<i>Cladosporium cladosporioides</i> -DSM 62121	<i>Paenibacillus</i> sp. - Isolada CDB 003
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - DSM 1946	<i>Bacillus</i> sp. - Isolada CDB 004
<i>Panaeoulus papilionaceus</i> - DSM 1769	Isolada CDB 005 – não identificada
<i>Aureobasidium pullulans</i> - DSM 2404	

##### III. 1. 1. Manutenção da cultura

As culturas foram mantidas em tubos de ágar inclinado e em placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura, autoclavados a 121°C, por 15 min. Após a incubação na temperatura ideal, em incubadora Certomat HK – B. Braun, por 96 horas para as linhagens fúngicas e 24 horas para as linhagens bacterianas, as culturas foram conservadas em refrigerador e repicadas a cada mês.



A Tabela III.1 mostra as linhagens utilizadas, com os respectivos meios de manutenção e a temperatura ideal de incubação para cada microrganismo.

**TABELA III. 1.** Microrganismos, meios de manutenção e temperatura de incubação dos microrganismos testados.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio de Manutenção</b>	<b>Temperatura de Incubação (°C)</b>
1. <i>Aspergillus niger</i> - DSM 821	BDA*	30
2. <i>Aspergillus niger</i> - DSM 2466	MEP**	24
3. <i>Aspergillus ficcum</i> - DSM 2466	BDA	24
4. <i>Aureobasidium pullulans</i> - DSM 3042	MEP	24
5. <i>Penicillium purpurogenum</i> - DSM 62866	MEP	24
6. <i>Chrysosporium pannorum</i> - DSM 62116	MEP	20
7. <i>Cladosporium cladosporioides</i> - DSM 62121	BDA	24
8. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - DSM 1946	MEP	22
9. <i>Panaeoulus papilonaceus</i> - DSM 1769	MEP	24
10. <i>Aureobasidium pullulans</i> - DSM 2404	BDA	24
11. <i>Cladosporium cladosporioides</i> - UFPE 2830	BDA	30
12. <i>Penicillium purpurogenum</i> - UFPE 2705	CZ***	30
13. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - UFPE 806	BDA	30
14. <i>Aureobasidium pullulans</i> - UFPE 2837	BDA	30
15. <i>Pennicilium rugulosum</i> - UFPE 1864	CZ	30
16. <i>Aspergillus niger</i> - UFPE 3292	CZ	30
17. Isolada CDB 003	IB****	50
18. Isolada CDB 004	IB	50
19. Isolada CDB 005	IB	50

\* BDA (Batata Dextrose Ágar) - 20 g de glicose, 15 g de ágar, dissolvidos em 1 L de infusão de batatas (200 g de batatas descascadas e picadas, fervidas em 1 L de água por 1 hora e peneiradas).

**\*\* MEP (Extrato de Malte Peptona Ágar)** - 30 g/L de extrato de malte, 3,0 g/L de peptona de soja e 15 g/L de ágar.

**\*\*\* CZ (Meio Czapec)** - 30 g/L de sacarose, 3,0 g/L de  $\text{NaNO}_3$ , 0,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L de KCl, 0,01 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 13,0 g/L de ágar.

**\*\*\*\* IB (Meio para linhagens bacterianas proposto por TSHISUAKA (resultados não publicados))** - 5,0 g/L de inulina, 0,9 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,7 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,0 g/L de ácido succínico, 0,5 g/L de extrato de levedura, 18 g/L de ágar e 1,0 mL de uma solução de elementos-traço (5,0 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,45 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g/L de  $\text{MnCl}_2$ , 0,3 g/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L de  $\text{CuSO}_4$ , 0,1 g/L de KI e 0,04 g/L de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ).

## **III. 2. MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO**

### **III. 2. 1. Seleção de fungos produtores de inulinases**

As linhagens fúngicas descritas na Tabela III.1. (1 a 16) foram testadas quanto ao crescimento em presença de inulina como única fonte de carbono, em placas de Petri contendo um meio de cultivo para isolamento e seleção de fungos produtores de inulinase (meio IF), proposto por VANDAMME & DERYCKE (1983), autoclavado a  $121^\circ\text{C}$ , por 15 min, composto de 10 g/L de inulina, 1,0 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 g/L de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1,5 g/L de  $\text{NaNO}_3$ , 0,5 g/L de KCl, 0,1 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 18 g/L de ágar, pH 6,0.

O meio de cultivo foi inoculado com um disco de ágar medindo 0,8 cm de diâmetro, contendo micélio obtido da cultura de manutenção. As placas foram incubadas em incubadora Certomat HK – B. Braun, na temperatura ideal para cada microrganismo (Tabela III. 1.), durante 144 horas. O experimento foi realizado em quadruplicata e os resultados foram avaliados em termos de crescimento da colônia, através de análise visual do micélio formado.

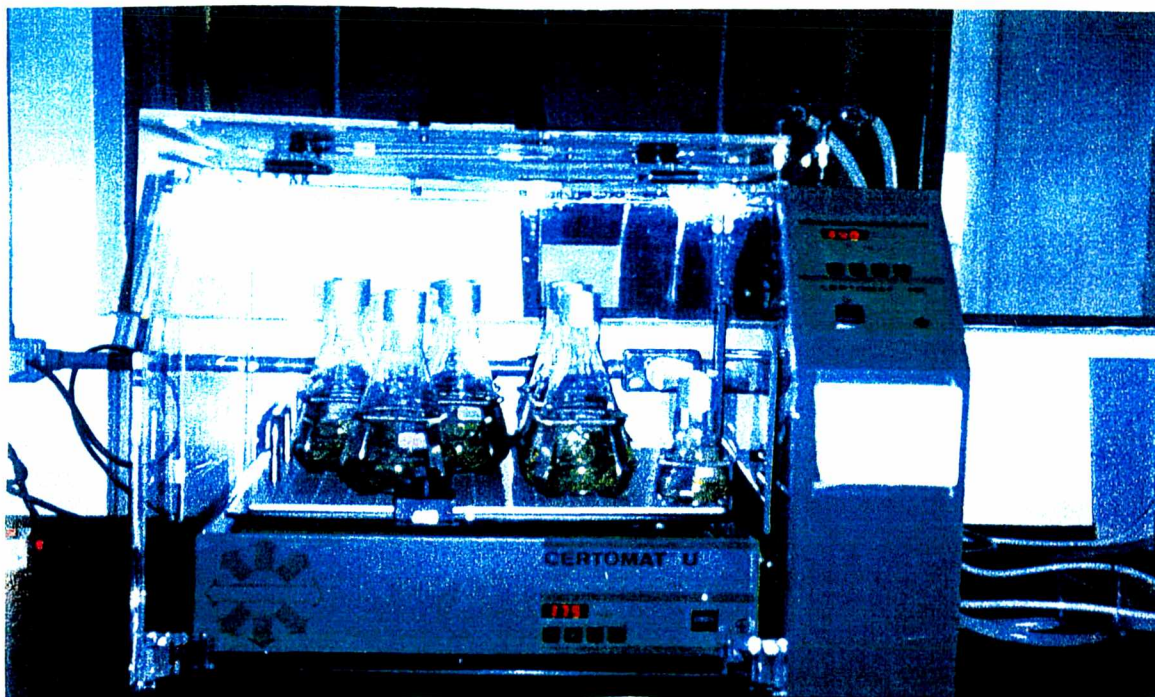
### **III. 2. 2. Seleção de fungos produtores de endo-inulinases**

Nesta etapa do trabalho, as quatro linhagens fúngicas selecionadas após análise dos resultados do experimento descrito no item III. 2. 1, foram testadas em fermentação submersa quanto à produção de endo-inulinase.

O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo descrito no item III. 2. 1 (meio IF). Para os experimentos realizados em fermentação submersa, os componentes do meio de cultivo foram autoclavados a 121° C, exceto a inulina, que foi filtrada isoladamente, à vácuo, em condições estéreis (fluxo laminar), utilizando-se membrana Schleicher & Schuell AE 97, de 0,2 µm de porosidade. Este procedimento foi utilizado para evitar a reação de Maillard e/ou hidrólise ácida/térmica durante a etapa de esterilização.

Os frascos foram inoculados com três discos de ágar de 0,8 cm de diâmetro, obtidos com o auxílio de um furador de rolhas, de uma placa de Petri contendo o fungo e incubados em agitador Certomat U - B. Braun de movimento recíproco (Figura III.1), na temperatura ideal, controlada através da incubadora Certomat HK - B. Braun a 220 min<sup>-1</sup>, por dez dias. O experimento foi realizado em duplicata.

A amostragem consistiu na retirada periódica de 2 mL do caldo de fermentação, de modo que o volume final de meio não fosse inferior a 90% do volume inicial, para que o sistema pudesse ser considerado perfeitamente agitado (volume constante). A amostra foi, então, centrifugada em centrífuga Eppendorf, a 12000 min<sup>-1</sup>, por 10 minutos e o sobrenadante do caldo de fermentação foi utilizado para medida do pH, determinação do consumo de substrato e da presença de oligômeros. A concentração celular final foi obtida por gravimetria, após dez dias de fermentação.



**FIGURA III. 1.** Sistema de fermentação submersa em frascos Erlenmeyer, composto de duas partes: sistema de agitação Certomat U – B. Braun e incubadora Certomat HK – B. Braun.

### **III. 2. 3. Comparação entre o fungo selecionado e as linhagens bacterianas isoladas, quanto à produção de endo-inulinases**

Paralelamente à etapa descrita no item III. 2. 2, três linhagens bacterianas foram isoladas nos laboratórios do CDB, a partir de solos próximos a bulbos de dália. Seguiu-se, então, uma comparação entre o desempenho destas três cepas bacterianas (CDB 003, CDB 004 e CDB 005) e o fungo selecionado após análise dos resultados do experimento descrito no item III. 2. 2, quanto a produção de endo-inulinase.

O cultivo do fungo selecionado seguiu as mesmas condições descritas no item III.2.2., exceto para a inoculação, onde para uma melhor padronização do inóculo, utilizou-se 1 mL de uma suspensão de esporos em água contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  esporos/mL.

As linhagens bacterianas foram cultivadas no meio mineral IB, com pH inicial ajustado para 6,5 com NaOH 6M.

Frascos Erlenmeyer de 100 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo foram inoculados com 0,5 mL de uma suspensão celular e incubados em agitador com movimento rotatório



Certomat U – B. Braun, a  $160 \text{ min}^{-1}$ , por 96 horas, com temperatura controlada em  $50^\circ \text{C}$  através de uma incubadora Certomat HK – B. Braun. A suspensão celular foi obtida através da ressuspensão de três alçadas de células, provenientes de um tubo inclinado, em 1,5 mL de água esterilizada.

Aliquotas de 1,5 mL do caldo de fermentação foram retiradas em 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram centrifugadas a  $12000 \text{ min}^{-1}$ , por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para medida do pH, determinação do consumo de substrato e presença de oligômeros. O experimento foi realizado em duplicata.

#### **III. 2. 4. Otimização do teste de hidrólise enzimática da inulina**

De maneira a definir as melhores condições para a realização da hidrólise enzimática da inulina, foram testadas diferentes condições de incubação substrato/enzima variando-se a temperatura ( $40$ ,  $50$  e  $60^\circ \text{C}$ ), o tempo de incubação (1; 2,5; 5; 8 e 24 horas) e a proporção substrato/enzima (1:2 e 1:5). A enzima utilizada foi obtida do caldo de 48 horas de fermentação da inulina pelo microrganismo CDB 003, nas condições descritas no item III. 2. 3.

O experimento foi realizado em duplicata, em frascos Eppendorf, num volume total de 1 mL, incubados em Termomixer Eppendorf, conforme metodologia descrita no item III. 3. 7.

1. Os produtos da hidrólise da inulina foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (“Thin Layer Chromatography” - TLC), conforme metodologia descrita no item III. 3. 4.

#### **III. 2. 5. Definição do meio de cultivo**

Após a definição do microrganismo melhor produtor de endo-inulinase, utilizando a técnica de planejamento experimental, foram testadas diferentes concentrações de inulina, fontes de nitrogênio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura e frequências de agitação, conforme metodologia indicada a seguir.

Para o preparo do inóculo, um frasco Erlenmeyer de 100 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo IB, foi inoculado com três alçadas da cepa, obtida da cultura de manutenção, e incubado a  $50^\circ \text{C}$ ,  $160 \text{ min}^{-1}$ , por 24 horas em incubadora Certomat HK e U – B. Braun respectivamente. A fração de inóculo utilizada foi de 1% (v/v) ou seja, 1 mL do pré-inóculo.

O experimento foi realizado em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo a ser avaliado, incubados a 50°C e 160 min<sup>-1</sup> em incubadora Certomat HK e U – B. Braun respectivamente.

Utilizou-se um plano fatorial fracionado, em dois níveis (BOX *et al.*, 1978), conforme descrito no item III. 2. 9.

O planejamento experimental descrito na Tabela III. 2 consistiu na realização de oito experimentos que permitiram o estudo de cinco parâmetros em dois níveis ( $2^{5-2}$ ).

**TABELA III.2.** Planejamento experimental utilizado para otimização do meio de cultivo e da frequência de agitação.

VARIÁVEIS		NÍVEIS	
		+	-
A - [INULINA]		1%	0.5%
B -[EXTRATO DE LEVEDURA]		0.25%	0.05%
C - [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]		0.9%	0.09%
D - [ÁCIDO SUCCÍNICO]		0.1%	0.01%
E - AGITAÇÃO		220 min <sup>-1</sup>	160 min <sup>-1</sup>

VARIÁVEIS					
MEIOS	A	B	C	D	E
M1	-	-	-	+	-
M2	+	-	-	+	+
M3	-	+	-	-	+
M4	+	+	-	-	-
M5	-	-	+	-	+
M6	+	-	+	-	-
M7	-	+	+	+	-
M8	+	+	+	+	+

Tendo-se tomado como base para este trabalho o meio IB, todos os meios acima descritos foram acrescidos de 0,02% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,09% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,07% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1mL/L de elementos-traço.

Para a amostragem, foram retirados 2 mL de amostra em 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação. A amostra foi centrifugada em centrífuga Eppendorf ( $12000 \text{ min}^{-1}$ , 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para medida do pH, consumo de substrato (hidrólise ácida) e presença de oligômeros.

### **III. 2. 6. Substituição da inulina comercial por extrato de chicória**

Este experimento teve como objetivo avaliar a produção de endo-inulinase pelo microrganismo selecionado, em um meio mineral contendo extrato de chicória como fonte de inulina, em substituição à inulina comercial.

#### **III.2.6.1. Preparo do extrato de chicória**

À 75 g de raízes de chicória (*Cichorium intybus* variedade cassel) desidratadas, obtidas do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisa em Química, Biologia e Agronomia), lavadas e picadas, foram adicionados 825 mL de água comum. A extração da inulina a partir das raízes foi feita em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , por 20 minutos, de acordo com metodologia descrita por MANZONI E CAVAZONI (1988). O extrato foi, posteriormente, filtrado à vácuo em papel filtro comum, analisado em HPLC para determinação da concentração de inulina e estocado à  $-20^\circ\text{C}$ .

Para utilização nos experimentos subsequentes, o extrato de chicória foi descongelado, diluído em água deionizada até obtenção da concentração de inulina desejada e filtrado à vácuo, em condições assépticas, em sistema de filtração Sartorius, utilizando membrana Schleicher & Schuell AE 97, de  $0,2 \mu\text{m}$  de porosidade.

#### **III.2.6.2. Utilização do extrato de chicória**

Frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio mineral IB1, duas vezes concentrado, isento de inulina, foram acrescidos de 50 mL de uma solução de extrato de chicória contendo 10 g/L de inulina e inoculados com 1mL da pré-cultura descrita no item III.2.5. A concentração final de inulina no meio de cultivo foi de 5 g/L.



A comparação dos resultados foi realizada em relação a um meio controle IB1, contendo inulina comercial. Os frascos foram incubados a 50°C, em incubadora Certomat HK – B. Braun e agitados com agitador de movimento rotatório (Certomat U – B. Braun), a 160 min<sup>-1</sup>, por 48 horas.

Aliquotas de 2 mL do caldo de 24 e 48 horas de fermentação foram retiradas, centrifugadas a 12000 min<sup>-1</sup> em centrífuga Eppendorf, por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise do consumo de substrato e produção de oligômeros de frutose.

### **III. 2. 7. Influência da temperatura sobre o crescimento celular e a atividade enzimática**

Utilizando o meio e as condições de cultivo definidos no item III. 2. 6, várias temperaturas de incubação do microrganismo isolado, foram testadas, para posterior avaliação da produção de endo-inulinase.

Para tanto, frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo, foram inoculados com 1 mL de inóculo, preparado conforme descrito no item III.2.5.

Os frascos foram incubados em agitador de movimento rotatório (Certomat U – B. Braun), a 160 min<sup>-1</sup>, nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, controladas em incubadora Certomat HK – B. Braun, por 48 horas.

Aliquotas de 2 mL do caldo de 24 e 48 horas de fermentação foram retiradas, centrifugadas a 12000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga Eppendorf e o sobrenadante foi utilizado para análise do consumo de substrato e produção de oligômeros de frutose.

### **III. 2. 8. Influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ), do pH e da concentração do íon fosfato sobre o crescimento celular e a atividade enzimática**

Utilizando a técnica de planejamento experimental, avaliou-se a influência do pH, do  $K_{La}$  e do íon fosfato sobre o crescimento celular do microrganismo isolado.

Os experimentos foram realizados em fermentador Biostat MD B. Braun, com cuba de 2L, contendo 1,5 L de meio de cultivo.

O preparo do fermentador envolveu a montagem do vaso de fermentação com os seguintes itens, como pode-se observar na Figura III. 2:



1. sonda de temperatura
2. eletrodo de pH
3. eletrodo de  $pO_2$
4. sistema de adição de ácido e base
5. condensador
6. "loop" para retirada de amostra ligado à bomba peristáltica
7. aspersor de ar
8. agitador com três turbinas fixadas a 1 cm, 4,5 cm e 7,5 cm, a partir da extremidade livre.

Os dispositivos de entrada de inóculo, antiespumante e meio de cultivo não estão descritos na figura.

A cuba de fermentação, contendo 750 mL do meio de cultivo duas vezes concentrado, exceto o extrato de chicória, foi esterilizada por 30 min a 121°C em autoclave. O extrato de chicória duas vezes concentrado, foi filtrado assepticamente em sistema de filtração Sartorius, utilizando membrana Schleicher & Schuell AE 97, de 0,2  $\mu m$  de porosidade e transferido para a cuba de fermentação com auxílio de conexões apropriadas.

Após esterilização e resfriamento da cuba, o eletrodo de oxigênio foi conectado à DCU (Unidade de Controle do Fermentador), para polarização, 15 h antes da calibração e início do processo.

O eletrodo de pH permaneceu em água deionizada por, pelo menos, 6 horas antes da calibração. Esta sonda foi lavada com álcool etílico 70% e, em seguida, enxaguada com água deionizada esterilizada e instalada na cuba de fermentação em ambiente aséptico.

Uma vez terminada esta etapa, os passos seguintes foram a calibração do eletrodo de oxigênio, como descrito no item III. 3. 5. 2 e a medição do  $K_La$  conforme descrito no item III. 3. 6.

A Figura III. 3 apresenta as unidades que compõem o fermentador (cuba de fermentação, registrador, DCU, sistema de adição de ácido e base e bomba peristáltica para retirada de amostra).

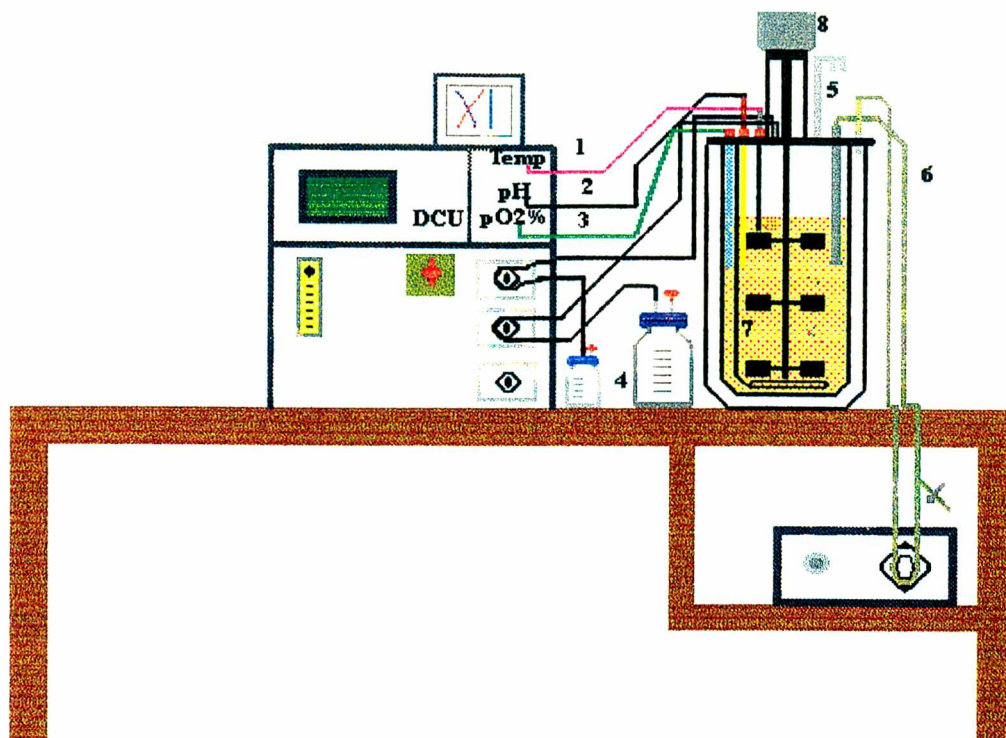


FIGURA III. 2. Esquema do sistema de fermentação em biorreator.

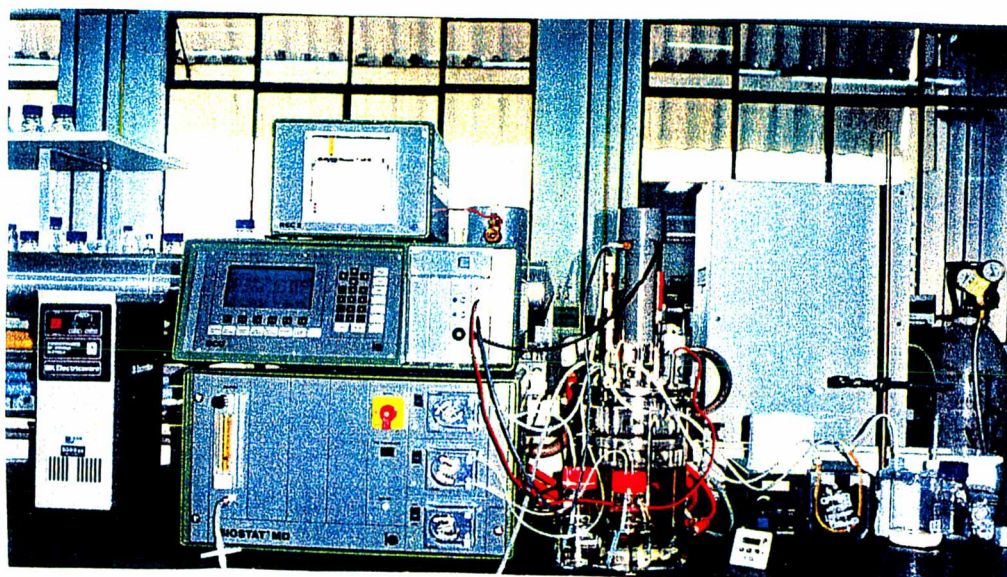


FIGURA III. 3. Dispositivo experimental de fermentação.

Utilizou-se o meio e as condições de cultivo definidos nos itens anteriores, com exceção do ácido succínico. Este componente foi retirado do meio de cultivo, uma vez que experimentos realizados nos laboratórios do CDB demonstraram que sua influência na produção de endo-inulinase ocorria somente em nível de tamponamento do meio, não sendo necessária sua utilização em experimentos com pH controlado (resultados não apresentados).

O planejamento experimental foi realizado conforme metodologia descrita no item III. 2. 9, analisando-se três parâmetros em dois níveis, em quatro experimentos ( $2^{3-1}$ ), mostrados na Tabela III. 3.

**TABELA III. 3.** Planejamento experimental utilizado para otimização das condições de cultivo.

VARIÁVEIS	NÍVEIS	
	+	-
A - $K_{La}$	60 h <sup>-1</sup>	30 h <sup>-1</sup>
B - pH	6,5	5,5
C - $(PO_4)^-$	4 mM	0

	$K_{La}$	pH	$(PO_4)^-$
<b>EXP 1</b>	-	+	-
<b>EXP 2</b>	-	-	+
<b>EXP 3</b>	+	-	-
<b>EXP 4</b>	+	+	+

O inóculo foi preparado conforme descrito no item III. 2. 5 e utilizado numa fração de 1% para inocular o meio de cultivo.

O  $K_{La}$  no nível (-) foi obtido utilizando-se uma agitação de 300 rpm e uma aeração de 0,5 vvm (volume de ar/volume de meio/minuto). Para o nível (+), utilizou-se uma agitação de 350 rpm e 1 vvm de aeração.

A influência do íon fosfato foi investigada, comparando-se os resultados das fermentações em presença e ausência deste íon. Nos experimentos realizados em presença do

ion fosfato, foi adicionado fosfato de sódio de modo a se obter uma concentração, no meio de cultivo, equivalente a 4 mM. O experimento foi realizado a uma temperatura de 50°C.

Alíquotas de 4 mL do caldo de fermentação foram retiradas em intervalos regulares, centrifugadas a 12000 min<sup>-1</sup>, por 10 minutos em centrífuga Eppendorf e o sobrenadante foi utilizado para análise da concentração celular, do consumo de substrato e da produção de oligômeros de frutose.

### III. 2. 9. Planejamento experimental

Para realizar um planejamento experimental deve-se fixar um número de variáveis (n) para cada um dos fatores ou variáveis (k). Realizando os experimentos em todas as combinações possíveis, ter-se-á um plano fatorial completo (n<sup>k</sup>). Na maioria dos casos, para os estágios iniciais de experimentação, são utilizados dois níveis para cada variável. Desta forma, um fatorial completo envolvendo cinco variáveis em dois níveis, requer 32 ensaios. Este mesmo conjunto de ensaios pode ser realizado de forma a constituir planos fracionados realizando-se metade, um quarto, um oitavo ou um dezesseis avos dos experimentos, performando planos fatoriais fracionados 2<sup>5-1</sup>, 2<sup>5-2</sup>, 2<sup>5-3</sup> e 2<sup>5-4</sup>, nos quais são realizados 16, 8, 4 e 2 experimentos, respectivamente. Evidentemente que à medida em que o plano vai sendo fracionado, diminui-se gradualmente a quantidade de informações obtidas.

Os efeitos principais e os efeitos de interação são a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior. Usando a letra T para representar este efeito, e sendo  $\overline{y_i}$  a resposta média observada no *i*-ésimo ensaio, podemos escrever:

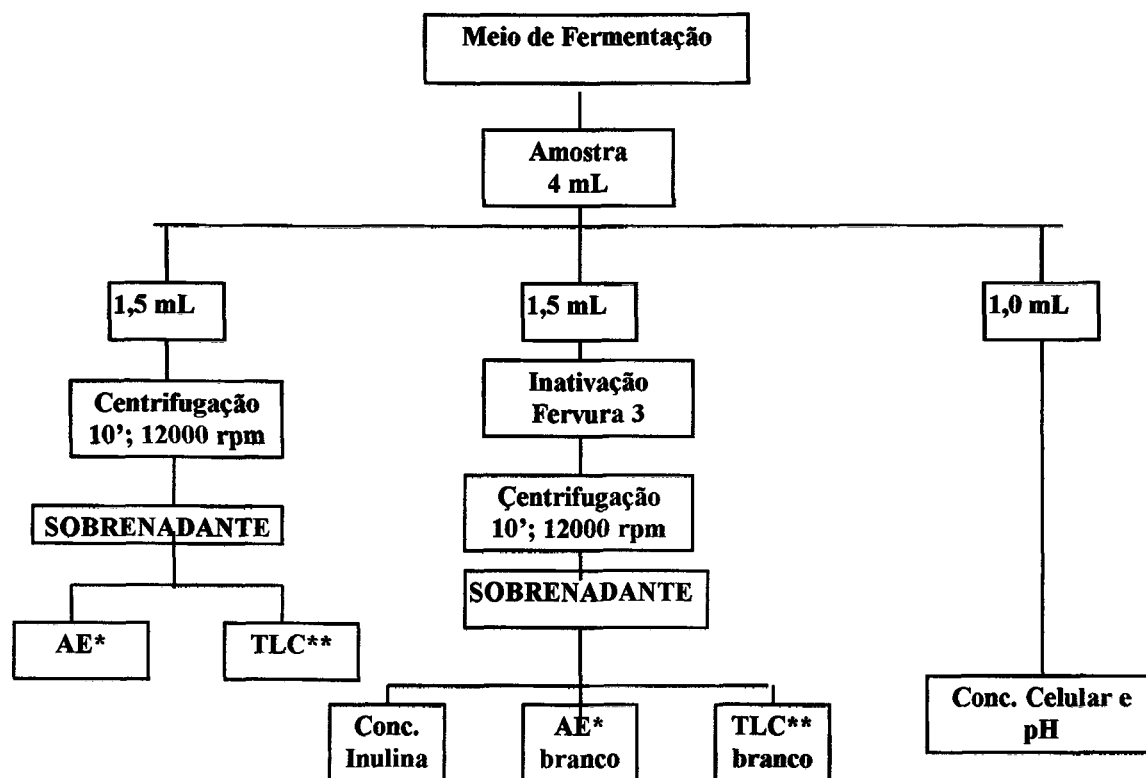
$$T = \overline{y_+} - \overline{y_-}$$

## III. 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

### III. 3. 1. Esquema de amostragem

A Figura III.4. apresenta, de forma simplificada, o procedimento de tratamento das amostras, utilizado em experimentos realizados em fermentador. O volume e o número de amostras foram reduzidos quando os experimentos foram realizados em frascos agitados, de

modo que o volume total de amostra coletado durante cada fermentação não excedesse 10% do volume inicial de meio, para que o reator pudesse ser considerado perfeitamente agitado (volume constante).



\*AE: atividade enzimática

\*\*TLC: Cromatografia em Camada Delgada

**FIGURA III. 4.** Representação esquemática do procedimento de amostragem.

### III. 3. 2. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria. Leituras de absorvância das suspensões de células provenientes das fermentações foram feitas em espectrofotômetro LKB a 610 nm e convertidas em concentração celular (g/L) por meio de uma curva de correlação entre a absorvância e o peso seco.

Para a construção da curva de correlação, utilizou-se uma suspensão de células da linhagem selecionada, cultivadas no meio IB, de absorvância igual a 0,589, a partir da qual

diferentes diluições foram feitas. Para cada suspensão diluída, fez-se a leitura da absorbância a 610 nm, em espectrofotômetro LKB. Em seguida, 15 mL de cada uma das suspensões foram colocados em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados. Após secagem até peso constante (24 h a 80°C), a biomassa foi determinada pela diferença de peso seco.

A concentração celular (g/L) de cada suspensão foi relacionada com sua respectiva absorbância, para obtenção de uma curva de correlação, que foi utilizada para a estimativa da concentração celular em todos os experimentos realizados em fermentador. A curva obtida apresentou um trecho linear compreendendo valores de absorbância entre 0,1 e 1,4 (Figura A.1, em anexo).

A equação matemática que descreve este trecho apresenta coeficiente de correlação (r) igual a 0,995 e é representada pela expressão:

$$X = (ABS + 0,03)/0,165$$

onde X = concentração de células (g/L) e ABS = absorbância da suspensão diluída

### **III. 3. 3 Determinação do consumo de substrato**

A concentração substrato foi determinada após hidrólise ácida da inulina, descrita no item III. 3. 3. 1, seguida da determinação da concentração de frutose e glicose liberadas, através de teste enzimático descrito no item III. 3. 3. 2.

#### **III. 3. 3. 1. Hidrólise ácida da inulina**

À 200 µL do caldo de fermentação foram adicionados 800 µL de uma solução de ácido perclórico 0,3 M. A mistura foi incubada em Termomixer Eppendorf, sob agitação, a 80 °C, por 15 minutos (BEUTLER, 1984). Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida com a incubação da amostra no gelo. A inulina, em presença de um meio ácido, é hidrolisada à frutose como principal produto e glicose em pequenas quantidades.

### III.3.3.2. Teste enzimático para determinação de glicose e frutose

#### a) Princípio do método

Neste método, D-glicose e D-Frutose são fosforiladas pela enzima hexoquinase (HK) e por trifosfato de adenosina (ATP), à glicose-6-fosfato (G-6-P) e frutose-6-fosfato (F-6-P), com formação simultânea de difosfato de adenosina (ADP).

**HK**



**HK**



Na presença da enzima glicose-6-fosfato deidrogenase (G6P-DH), a G-6-P é oxidada pela nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) a gluconato-6-fosfato, com formação de nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) (3):

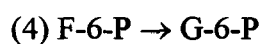
**G6P-DH**



A quantidade de NADPH formada nesta reação é estequiometricamente igual à quantidade de glicose existente. O aumento de NADPH é medido através da leitura da absorbância, a 340 nm.

A F-6-P é convertida a G-6-P pela atuação da enzima fosfoglicose isomerase (PGI) (4):

**PGI**



Do mesmo modo que na reação (3), a G-6-P formada reage com o NADP formando gluconato-6-fosfato e NADPH. A quantidade de NADPH obtida nesta reação é estequiométrica com a quantidade de frutose existente. O aumento de NADPH é medido através do aumento da absorbância, a 340 nm.



### **b) Dosagem de glicose e frutose**

O teste de determinação de glicose e frutose foi descrito por BEUTLER (1984) e adaptado para uso no sistema "Microtiter Reader"(SLT), onde utilizou-se placas de "ELISA" (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) com 96 cavidades (POREP *et al.*, 1993b) . O volume total de cada cubeta é de 300  $\mu$ L, sendo que para este teste o volume útil foi de 200 $\mu$ L. Os testes foram realizados a 37°C e as leituras de absorbância foram feitas a 340 nm.

### **c) Curva de calibração**

Uma curva de calibração foi preparada a cada análise, com soluções de frutose em concentrações variando entre 0,05 e 0,5 g/L. A absorbância das soluções foi lida a 340 nm e a Figura A. 2, em anexo, mostra um exemplo de curva de correlação linear obtida entre a absorbância e a concentração de frutose. Como a molécula de inulina contém apenas uma unidade de glicose, a quantidade de glicose liberada nas amostras foi considerada desprezível.

### **d) Reagentes utilizados no teste enzimático**

- Reagentes do MIX:
  - TEA (trietanolamina) 0,5 M, pH 7,6 + MgCl<sub>2</sub> 30 mM
  - ATP 27 mM
  - NADP 20 mM
- Amostra: as amostras analisadas em Sistema "Microtiter Reader" foram diluídas de modo que a concentração de glicose e frutose não ultrapassasse ~ 0,5 g/L.
- Hexoquinase (HK) ("from yeasts") 1400 U/mL (Boehringer/Mannheim)
- Glicose-6-fosfato deidrogenase (G6P-DH) ("from yeasts"): 1750 U/mL (Boehringer/Mannheim)
- Fosfo-glicose-isomerase (PGI) ("from yeasts") 3500 U/mL (Boehringer/Mannheim)

A Tabela III. 4 mostra, de maneira esquemática, o procedimento do teste de determinação das concentrações de glicose e frutose.



**TABELA III. 4.** Procedimento de determinação das concentrações de glicose e frutose.

Soluções	Volume	Concentração no teste
Amostra	20 µL	0,05 a 0,5 g/L de frutose
Água	90 µL	-----
MIX:		TEA: 50 mM
TEA	20 µL	MgCl <sub>2</sub> : 3 mM
ATP	20 µL	ATP: 2,7 mM
NADP	10 µL	NADP: 2,0 mM
1ª Leitura: (E1)*		
HK/G6P-DH	20 µL	HK: 2,8 U/mL G6P-DH: 1,4 U/mL
2ª Leitura: (E2)*		
PGI	20 µL	PGI : 5 U/mL
3ª Leitura: (E3)*		

\* Quatro leituras são feitas em intervalos de 5 minutos cada uma.

### III. 3. 4. Avaliação da presença de oligômeros de frutose

Procedeu-se a uma análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (Thin Layer Chromatography - TLC). Neste tipo de cromatografia existe uma fase móvel (líquido) e uma fase estacionária (interface líquido-sólido). A fase móvel compete com os componentes da amostra pela adsorção na interface líquido-sólido. Como os componentes da amostra diferem entre si nas propriedades de adsorção e no tempo despendido na fase móvel, tendem a separar-se um dos outros, conforme vão se movendo (PERRY *et al.*, 1973).

Realizou-se, inicialmente, a hidrólise da inulina pela enzima contida no sobrenadante do caldo de fermentação. A 150 µL de uma solução de inulina 1% em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, foram adicionados 150 µL de amostra. A mistura foi incubada em Termomixer Eppendorf, a 50°C, por 1 hora (experimentos descritos nos item III. 2. 2 e III. 2. 3) ou por 5 horas (experimentos realizados após a otimização do teste de hidrólise enzimática da inulina: experimentos III. 2. 5, III. 2. 6, III. 2. 7 e III. 2. 8). Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida através da fervura em banho-maria, por 3 minutos.

Os produtos da reação foram analisados por TLC, aplicando-se 25 µL da amostra proveniente da fermentação por linhagens fúngicas e 2 µL da amostra proveniente da fermentação por linhagens bacterianas, em placas de alumínio contendo sílica (DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck). A redução do volume de amostra aplicada no caso do meio proveniente da fermentação por linhagens bacterianas deve-se ao fato destas amostras possuírem maior concentração da enzima.

As placas foram mergulhadas em cubas contendo uma mistura de solventes (clorofórmio, ácido acético e água, 6:7:1 v/v/v), até completa eluição, conforme metodologia utilizada por AZHARI *et al* (1989). Após a atuação dos solventes, as placas foram reveladas com uma solução contendo 1 mL de anilina e 1 g de difenilamina em 100 mL de acetona, acrescida de 10 mL de ácido orto-fosfórico 85% e aquecidas à 150°C. Pôde-se, então, observar a presença ou não de oligômeros de frutose como produto da reação, indicando a ação da endo-inulinase.

Para cada experimento, foi realizado um “branco”, que consistiu da hidrólise da inulina pela enzima inativada por fervura em banho-maria, durante 3 minutos.

O padrão utilizado consistiu de 0,01 g/mL de uma solução composta de Neosugar (43,05% de 1-estose, 45,44% de nystose, 7,68% de 1-frutosil nystose, 0,10% de frutose, 0,12% de glicose e 3,60% de sacarose), sacarose, glicose e frutose.

### **III. 3. 5. Medida da concentração de oxigênio dissolvido**

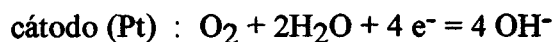
Durante as fermentações realizadas em fermentador MD - B.Braun, a pressão parcial de oxigênio dissolvido foi monitorada através de eletrodo polarográfico esterilizável INGOLD.

#### **III.3.5.1. Princípio de funcionamento do eletrodo**

O eletrodo opera com princípio polarográfico e consiste de um ânodo de prata e um cátodo de platina, que são separados do meio de fermentação por uma membrana polimérica (teflon/silicone), permeável ao gás (oxigênio). O ânodo e o cátodo são conectados condutimetricamente por um eletrólito (solução de KCl), que forma uma fina camada entre a membrana e o cátodo.

Com uma voltagem adequada de polarização, o oxigênio, que se difunde através da membrana em direção ao cátodo, é reduzido. Esta reação química produz uma corrente elétrica, que é diretamente proporcional à pressão parcial de oxigênio no meio.

Reações:



### III. 3. 5. 2. Procedimento de calibração do eletrodo

Introduziu-se, no vaso de fermentação, uma corrente de nitrogênio, até que todo o oxigênio fosse expulso. Isto foi verificado através da estabilização da leitura da pressão parcial de oxigênio ( $p\text{O}_2$ ) em valores próximos a 0%. Neste momento definiu-se 0% de saturação de  $\text{O}_2$ .

A seguir, alterou-se a corrente, passando-se ar no sistema. No momento da saturação do meio com ar, este valor foi definido como 100%.

Este procedimento foi repetido por 3 vezes na própria cuba de fermentação, após esterilização, nas condições de operação (pH, temperatura, meio de cultivo).

### III. 3. 6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ )

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ ) inicial foi determinado com base no método “gassing-out”, descrito por WISE (1991), citado por RAINER (1990), que prevê a utilização de eletrodos com princípio polarográfico para medida da pressão parcial de oxigênio. Este método indireto, ou estático, por ser realizado na ausência de células, tem como princípio, medir a absorção de oxigênio em uma solução.

Inicialmente, preencheu-se o reator com o meio de cultura e ajustou-se as condições de operação. Em seguida, reduziu-se a zero a concentração de oxigênio dissolvido no líquido pela passagem de nitrogênio. Neste momento, reiniciou-se a aeração do líquido e registrou-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido em relação ao tempo.

A equação (1) descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

$dC/dt = K_L a (C^* - C) \quad (1)$
-------------------------------------

onde  $C^*$  - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)

$C$  - concentração de oxigênio dissolvido no instante  $t$  (mmol/L)

$$\left. \frac{dC}{(C^* - C)} \right|_{C=C}^{C=C^*} = K_L a \, dt \left|_{t=0}^{t=t} \quad (2)$$

Rearranjando e integrando a equação (2) no intervalo de  $t=0$  a  $t=t$ , temos:

$$\ln (C^* - C) = - K_L a \, t \quad (3)$$

ou ainda

$$\ln (1 - C/C^*) = - K_L a \, t \quad (4)$$

A equação (5) mantém uma correlação linear entre o  $\ln (1 - C/C^*)$  e o tempo, onde o coeficiente angular da reta fornece o valor de  $K_L a$ . No entanto, como a determinação da concentração de oxigênio na saturação é dificultada no meio de cultura devido a sua complexidade, definiu-se os seguintes limites de integração :

$t=0$  ;  $C = \alpha C^*$

$t=t$  ;  $C = \beta C^*$

Portanto:

$$\ln (C^* - \beta C^*) / (C^* - \alpha C^*) = - K_L a \, t \quad (5)$$

$$\ln (1 - \beta) / (1 - \alpha) = - K_L a \, t \quad (6)$$

onde  $\alpha$  é 10% da concentração de saturação em oxigênio e  $\beta$  varia de 10 a 80% da concentração de saturação em oxigênio.

### III. 3. 7. Determinação da atividade enzimática

Para determinação (quantitativa) da atividade da enzima endo-inulinase, a concentração de açúcares redutores obtidos como produto da reação da hidrólise da inulina (item III. 3. 7. 1), foi determinada pelo método do Ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A concentração de açúcares redutores obtida foi, então, diretamente relacionada com a atividade de endo-inulinase.

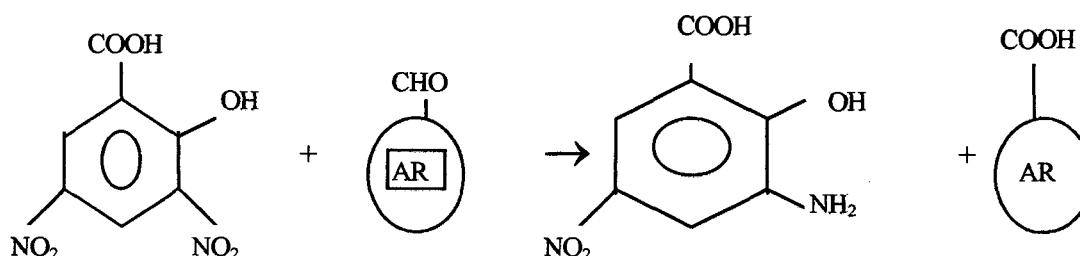
#### III. 3. 7. 1. Hidrólise da inulina

250 µL de uma solução de inulina 1% em solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, foram adicionados à 250 µL do caldo de fermentação. A mistura foi incubada em Termomixer Eppendorf, a 50°C, por 30 minutos. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida por fervura em banho-maria, durante 3 minutos.

#### III. 3. 7. 2. Determinação da concentração de açúcares redutores (Método DNS)

##### a) Princípio do método

Os açúcares redutores (AR) podem ser detectados ou determinados quantitativamente com base em sua oxidação. Os grupos aldeído são oxidados a grupos carboxílicos, em presença de ácido 3,5-dinitrossalicílico. O ácido 3,5-dinitrossalicílico (agente oxidante) é, por sua vez, reduzido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, que apresenta coloração amarelada. A intensidade da coloração, medida a 540 nm, é proporcional à concentração de açúcar redutor na amostra. A reação que descreve o princípio do método está representada na Figura III.5.



**Figura III. 5.** Redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico pelo açúcar redutor (AR), em meio alcalino.

## **b) Metodologia**

0,5 mL do Reagente DNS\* foram adicionados a 0,5 mL de amostra (inulina hidrolisada). A mistura foi aquecida em banho-maria por 5 minutos. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida, resfriando-se a mistura em água gelada. Após a adição de 5,0 mL de água deionizada, procedeu-se à leitura da absorbância da solução a 540 nm, em espectrofotômetro Shimadzu. Para cada amostra, foi preparado um “branco” correspondente, utilizando como amostra a enzima inativada por 3 minutos de fervura.

Uma curva de calibração foi construída para cada análise, utilizando-se como padrão soluções de frutose com concentrações variando de 0,05 a 0,5 g/L. A Figura A. 3, em anexo, mostra um exemplo de curva de correlação linear obtida entre a absorbância e a concentração de frutose.

### **\*Reagente DNS**

- 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico
- 8 g de NaOH
- 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio
- água deionizada - q.s.p. 500 mL

## **III. 3. 8. Determinação das características da endo-inulinase**

Os testes descritos a seguir foram realizados com frações da enzima produzida pelo microrganismo CDB 003 em estado bruto (sem qualquer purificação prévia), provenientes da mesma fermentação.

Os experimentos foram realizados em frascos Eppendorf, incubados em Termomixer Eppendorf e as determinações da concentração de açúcares redutores (A.R.) e atividade enzimática (AE) foram realizadas conforme metodologia descrita nos itens III. 3. 7. 2 e III. 3. 7, respectivamente.

### **III. 3. 8. 1. Estabilidade da enzima com o tempo de estocagem em diferentes temperaturas**

O caldo enzimático foi estocado em diferentes temperaturas (-18 °C, 4 °C e temperatura ambiente) e testes para determinação da atividade enzimática foram realizados no tempo 0 e após 5, 31 e 52 dias de estocagem.

### III. 3. 8. 2. Efeito da temperatura de incubação na atividade da enzima

A 1 mL do caldo enzimático foram adicionados 1 mL de uma solução de inulina a 2% (p/v), dissolvida em tampão fosfato 0,1 M, pH 5.0. A mistura foi incubada em diferentes temperaturas (40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C) e após 15 minutos, a reação foi interrompida em água fervente e a concentração de açúcares redutores e a atividade enzimática foram determinadas.

### III. 3. 8. 3. Determinação da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) e da Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )

Soluções de inulina em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5.0, foram preparadas em diversas concentrações (0,08, 0,20, 0,40, 0,80, 1,60, 2,40 e 3,20 mM). 1 mL destas soluções, foi adicionado 1 mL do caldo enzimático. A mistura foi incubada a 50 °C durante 30 minutos, sob agitação. Após este intervalo de tempo, a concentração de açúcares redutores foi determinada para cada amostra.

## III. 4. METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS

### III. 4. 1. Concentração de glicose e frutose

Expressões:

(E2 - E1): valor de absorbância a ser correlacionado à concentração de glicose

(E3 - E2): valor de absorbância a ser correlacionado à concentração de frutose

Equação:

$$(E3 - E2)_{\text{Amostra}} - (E2 - E1)_{\text{Branco}} = \text{abs} \quad (7)$$

Curva de calibração:

$$F = a + b \cdot \text{abs} \quad (8)$$

onde F= concentração de frutose (g/L)

abs = absorbância

A equação obtida para a curva de calibração serviu para determinar a concentração de frutose (g/L) nas amostras.

### III. 4. 2. Determinação da atividade enzimática

Uma vez obtido o valor da concentração de açúcares redutores, procedeu-se o cálculo da atividade enzimática (U/mL) para 30 minutos de reação.

Uma unidade de inulinase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores por minuto de reação nas condições de análise: [U] = [ $\mu\text{mol}$  açúcar redutor/min de reação].

$$AE = \frac{[AR] \cdot 10^6}{180 \cdot 1000 \cdot 30} \quad (10)$$

onde: AE = atividade enzimática (U/mL)

[AR] = concentração de açúcares redutores (g/L)

$10^6$  = fator de conversão mol ---->  $\mu\text{mol}$

180 = peso molecular da frutose

1000 = fator de conversão L -- -> mL

30 = tempo de reação (min)

$$AE \text{ (U/mL)} = [AR] \cdot 0,185 \quad (11)$$

### III.4.3. Concentração de inulina

Para o cálculo da concentração de substrato, procedeu-se conforme descrito no item III. 4. 1. A concentração de frutose é diretamente correlacionada com a quantidade de inulina presente na amostra.



### III. 4. 4. Fatores de conversão

Fator de conversão de substrato em produto –  $Y_{P/S}$  - (U de inulinase produzida/g de substrato consumido)

$$Y_{P/S} = \frac{AE_{\max} - AE_0}{S_0 - S_f} \times 10^3 \quad (12)$$

Fator de conversão de substrato em células : (g de células/g de substrato)

$$Y_{X/S} = (X_{\max} - X_0) / (S_0 - S_f) \quad (13)$$

Onde:

$X_{\max}$ ,  $AE_{\max}$  : valores máximos de concentração celular (g/L) e atividade enzimática (U/mL), respectivamente;

$X_0$ ,  $S_0$ ,  $AE_0$  : valores iniciais de concentração celular (g/L), concentração de substrato (g/L) e atividade enzimática (U/mL), respectivamente;

$S_f$  : concentração final de substrato (g/L), considerada no ponto onde a AE ou X foi máximo.

### III. 4. 5. Produtividade

Produtividade em enzima ( $U \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ):

$$P_{AE} = \frac{(AE_{\max} - AE_0) \times 10^3}{t} \quad (14)$$

Produtividade em células ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ):

$$P_X = (X_{\max} - X_0) / t \quad (15)$$

Produtividade específica (U. g células<sup>-1</sup> . h<sup>-1</sup>):

$$P_{\text{esp}} = \frac{AE_{\text{max}}}{t \cdot X'} \times 10^3 \quad (16)$$

Onde:

t = tempo de fermentação (h) correspondente a AE<sub>max</sub> (U/mL) ou a X<sub>max</sub> (g/L)

X' = concentração celular (g/L) correspondente à AE<sub>max</sub> (U/mL)

### III. 4. 6. Atividade enzimática específica

Atividade enzimática específica (U.g de células<sup>-1</sup>):

$$AE_{\text{esp}} = \frac{AE_{\text{max}} - AE_0}{X'} \times 10^3 \quad (17)$$

Onde : X' = concentração celular (g/L) correspondente à AE<sub>max</sub> (U/mL)

### III. 4. 7. Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento  $\mu_{\text{max}}$  foi calculada através do coeficiente angular da reta obtida plotando-se o logaritmo neperiano da concentração celular em função do tempo.

### III. 4. 8. Velocidade máxima de reação (V<sub>max</sub>) e Constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) para inulinase

A partir da medida de velocidade de reação para o tempo de 30 minutos, para diferentes concentrações de substrato, determinou-se K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> segundo o método descrito por Lineweaver-Burk (BAILEY & OLLIS, 1986), plotando-se o inverso da velocidade de reação em função do inverso da concentração de substrato. A expressão 18 mostra que, analogamente à equação da reta, o coeficiente linear e o coeficiente angular permitem estimar os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$$

(18)

onde  $V$  = velocidade em diferentes concentrações de substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )

$S$  = concentração de substrato (mM)

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV. 1. Seleção de fungos produtores de inulinases

O crescimento micelial de dezesseis linhagens fúngicas citadas na literatura como produtoras de endo-inulinases, foi observado visualmente durante dez dias, após os quais foi possível selecionar quatro linhagens que mostraram um melhor crescimento em presença de inulina como única fonte de carbono, no tempo determinado. A Tabela IV.1. mostra o desempenho de cada cepa.

**TABELA IV. 1.** Estimativa do crescimento dos fungos testados, em presença de inulina, após dez dias de incubação.

Microrganismo	Crescimento em presença de inulina *
3292- <i>Aspergillus niger</i> (UFPE)	+++
1864- <i>Penicillium rugulosum</i> (UFPE)	++
DSM 62116 - <i>Chrysosporium pannorum</i>	+
DSM 2404- <i>Aureobasidium pullulans</i>	-
DSM 1769- <i>Panaeolus papilionaceus</i>	-
2705- <i>Penicillium purpurogenum</i> (UFPE)	-
DSM 1946- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-
DSM 62121- <i>Cladosporium cladosporioides</i>	-
DSM 821 - <i>Aspergillus niger</i>	+++
DSM 2466- <i>Aspergillus niger</i>	+++
DSM 932- <i>Aspergillus ficcum</i>	+++
DSM 62866- <i>Penicillium purpurogenum</i>	-
DSM 3042- <i>Aureobasidium pullulans</i>	++
2837- <i>Aureobasidium pullulans</i> (UFPE)	-
2830- <i>Cladosporium cladosporioides</i> (UFPE)	-
806- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (UFPE)	-

\* +++ crescimento ótimo

++ bom crescimento

- sem crescimento

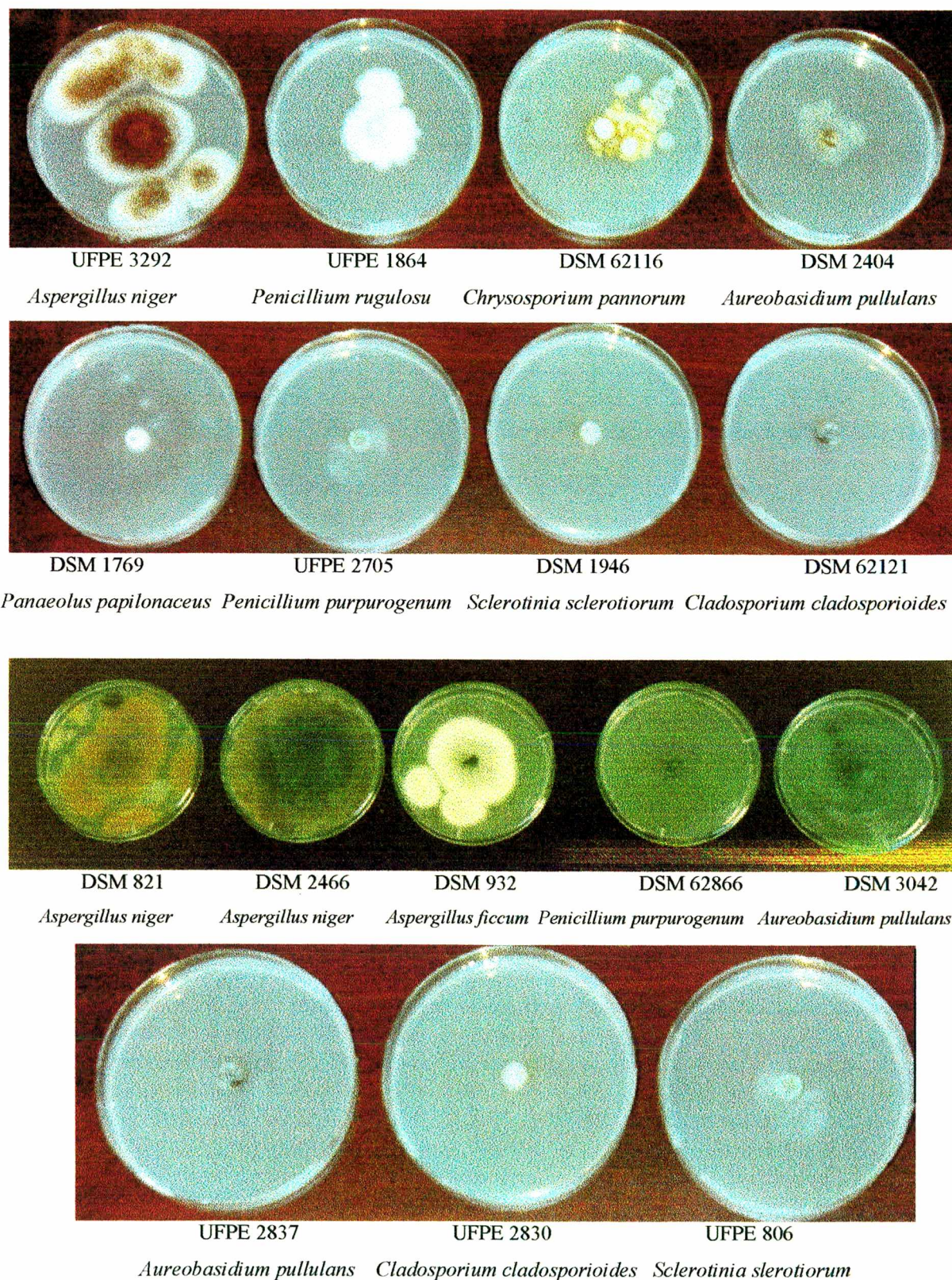
+ pouco crescimento

Nesta etapa, quatro linhagens foram selecionadas por apresentarem um rápido crescimento em presença de inulina como única fonte de carbono (as placas foram totalmente colonizadas em aproximadamente oito dias), indicando a produção de enzimas que degradam este polissacarídeo, ou seja, a presença de inulinases. Segundo VANDAMME & DERYCKE (1983), microrganismos produtores de inulinases normalmente formam colônias que solubilizam partículas de inulina no ágar, formando uma zona clara ao redor da colônia. Este fato não pôde ser observado neste experimento. Conforme mostra a Tabela IV. 1., as quatro linhagens do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus niger* DSM 821, *Aspergillus niger* DSM 2466, *Aspergillus ficcum* DSM 932, e *Aspergillus niger* 3042 UFPE) apresentaram melhor desempenho, sendo, portanto, selecionadas para utilização na segunda etapa dos trabalhos, cujos resultados estão reportados no item IV. 2.

Os resultados obtidos nesta primeira etapa do trabalho, estão de acordo com diversos autores que reportaram a produção de inulinases por fungos do gênero *Aspergillus* (ZITTAN, 1981; CARNITI, *et al.*, 1991; NORMAN & HOJER-PEDERSEN, 1989; AZHARI *et al.*, 1989; ETTALIBI & BARATTI, 1987; UHM *et al.*, 1987 e NAKAMUARA *et al.*, 1989).

A Figura IV. 1 mostra o desenvolvimento micelial dos fungos testados, após sete dias de incubação.



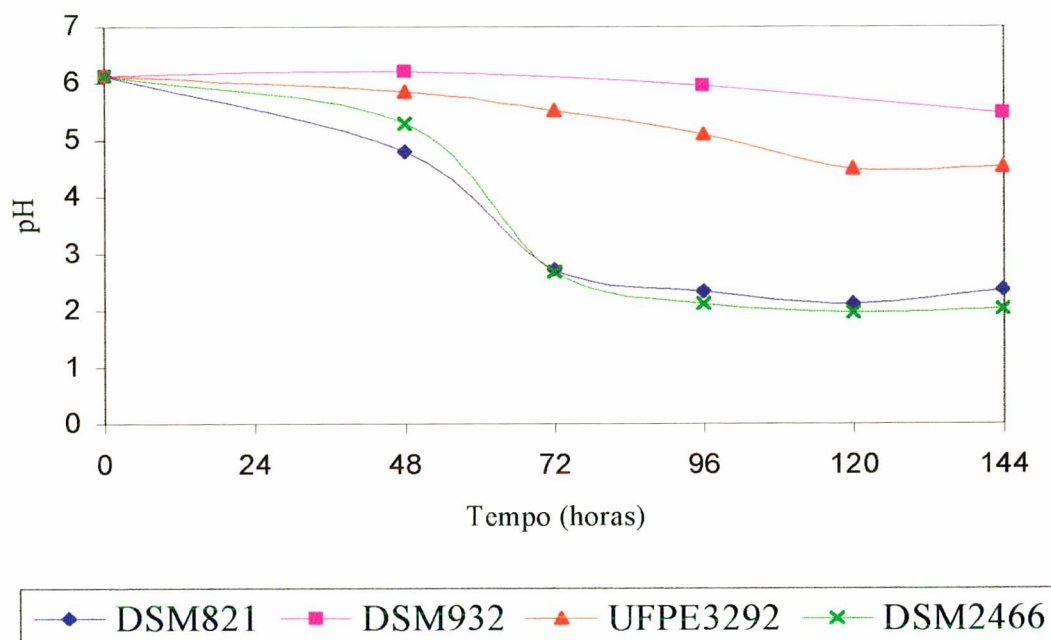


**FIGURA IV.1.** Desenvolvimento micelial dos diversos fungos testados, após sete dias de incubação sobre inulina como fonte de carbono.



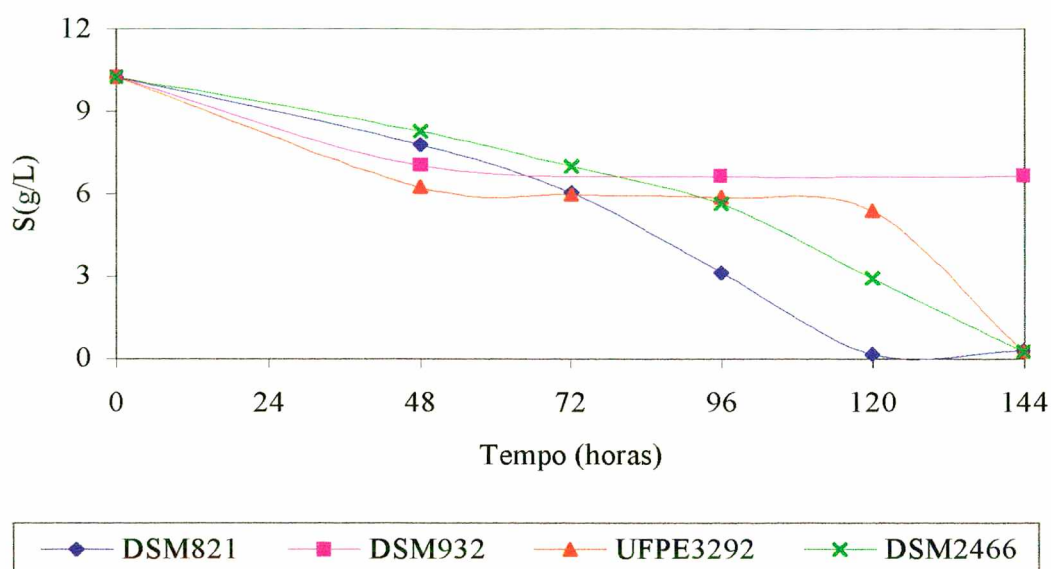
#### IV. 2. Seleção de fungos produtores de endo-inulinas

O pH inicial, após a inoculação, que era de aproximadamente 6.0 para todos os meios de fermentação, apresentou um decréscimo significativo no decorrer do cultivo para as linhagens DSM 2466 e DSM 821 e uma diminuição suave para as demais linhagens, conforme mostra a Figura IV. 2.



**FIGURA IV. 2.** Evolução do pH do meio de cultivo em função do tempo de fermentação para as linhagens DSM 821, DSM 932, UFPE 3292 e DSM 2466.

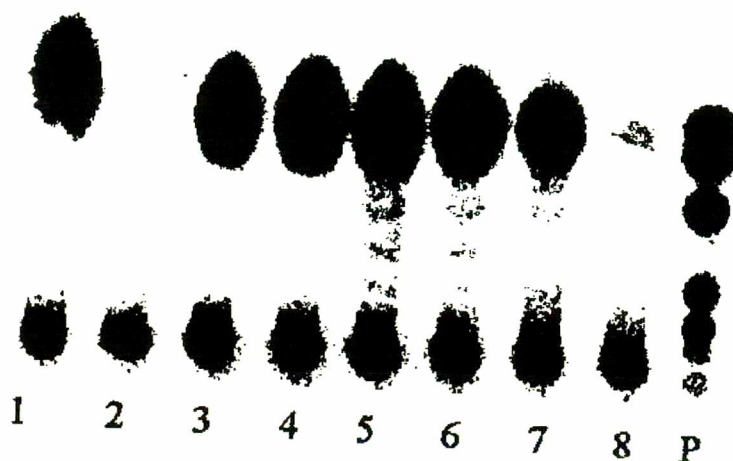
A Figura IV. 3 mostra a curva de consumo de substrato para as diferentes linhagens fúngicas testadas, onde pôde-se observar que nos meios onde houve um maior decréscimo do pH (DSM 2466 e DSM 821), a velocidade de consumo de substrato foi também superior.



**FIGURA IV. 3.** Curva do consumo de substrato em função do tempo de cultivo para as linhagens DSM 821, DSM 932, UFPE 3292 e DSM 2466.

Com base, então, nos resultados obtidos em cromatografia em camada delgada (Figura IV. 4), selecionou-se a cepa DSM 2466 como a melhor produtora de endo-inulinase. Apesar de todas as cepas terem apresentado oligômeros como resultado da hidrólise da inulina pelo caldo oriundo de 72 horas de fermentação, este microrganismo foi escolhido por tê-los apresentado com maior intensidade.





**FIGURA IV. 4.** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pelas linhagens DSM 821, DSM 932, UFPE 3292 e DSM 2466, após 144 horas de cultivo:

1 e 2 - DSM 821

3 e 4 - UFPE 3292

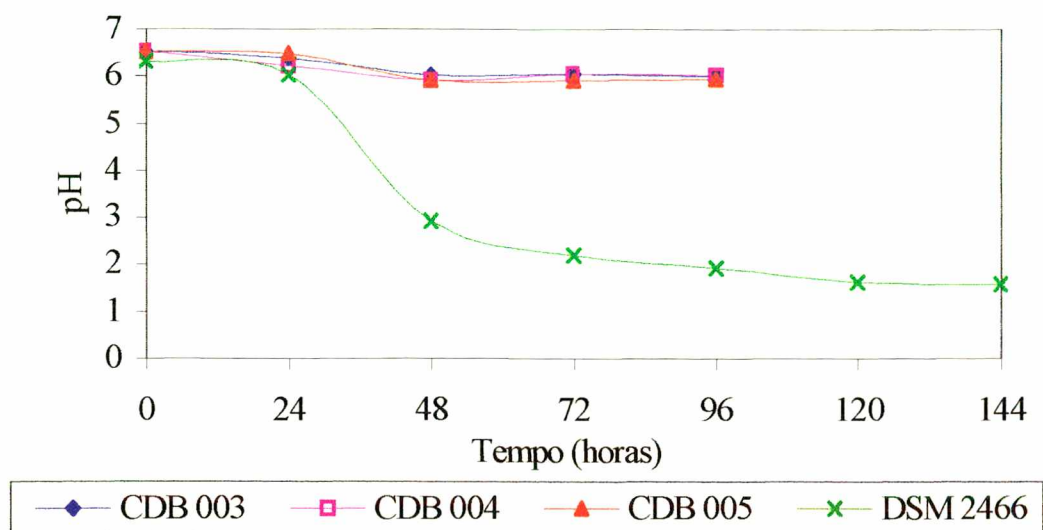
5 e 6 - DSM 2466

7 e 8 - DSM 932

P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)

#### **IV. 3. Comparação entre o fungo selecionado e as linhagens bacterianas isoladas quanto à produção de endo-inulinases**

As cepas CDB 003, CDB 004 e CDB 005, isoladas em trabalhos realizados no laboratórios do CDB, mantiveram o pH inicial (aproximadamente 6,5) ao longo das 96 horas de fermentação. O fungo selecionado *Aspergillus niger* DSM 2466, apresentou, no decorrer das 144 horas de fermentação, um decréscimo acentuado no pH, que finalizou em 1,58. A evolução do pH do meio de cultivo dos diferentes microrganismos avaliados está representada na Figura IV.5.



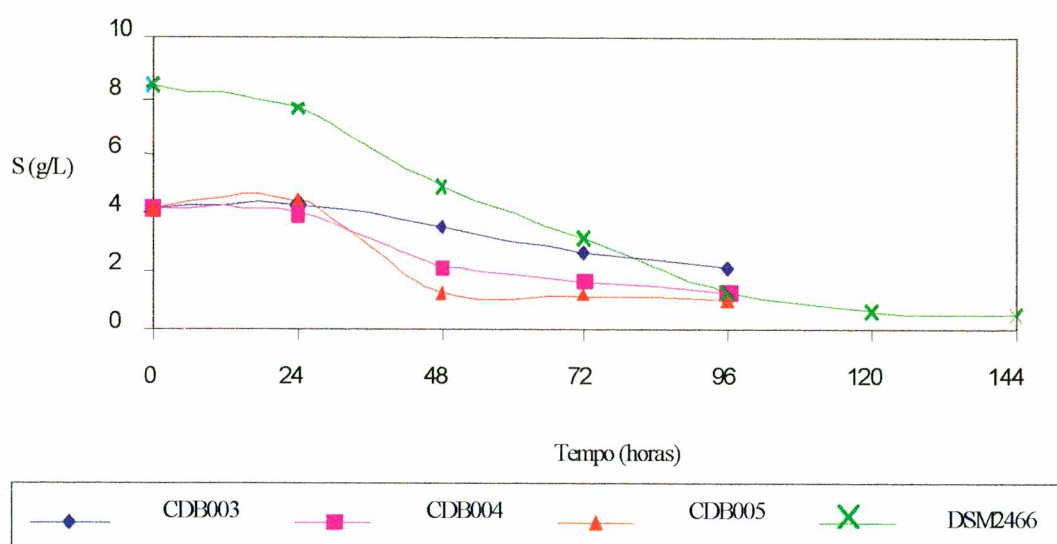
**FIGURA IV. 5.** Evolução do pH do meio de cultivo das linhagens CDB 003, CDB 004, CDB 005 e DSM 2466 em função do tempo de fermentação.

A concentração celular final para as três linhagens bacterianas (96 horas) e para a linhagem fúngica (144 horas), assim como a produtividade em células, estão descritas na Tabela IV. 2.

**TABELA IV. 2.** Concentração celular final ( $X$ ), tempo de cultivo ( $t$ ) e produtividade em células ( $P_X$ ) para as linhagens CDB 003, CDB 004, CDB 005 e DSM 2466.

Microrganismo	$X$ (g/L)	$t$ (h)	$P_X$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
CDB 003	2,48	96	0.03
CDB 004	2,16	96	0.02
CDB 005	2,04	96	0.02
DSM 2466	1,89	144	0.01

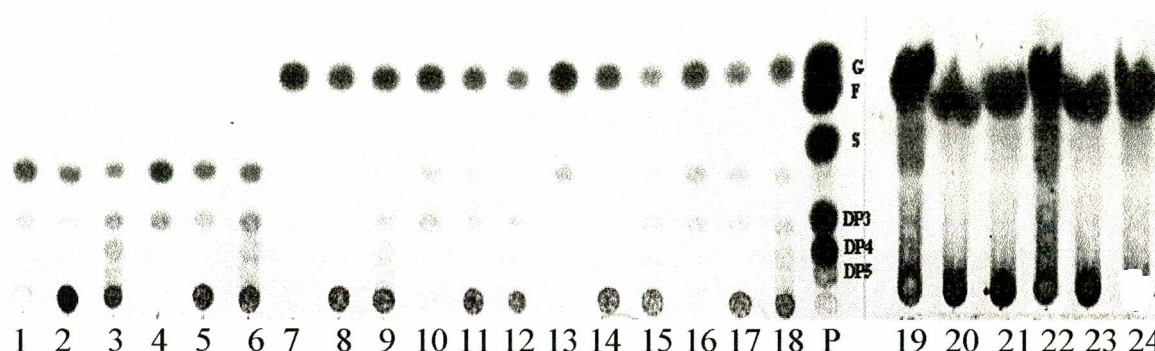
Partindo-se de uma concentração inicial previamente definida (TSHISUAKA, resultados não publicados) de 5 g/L de inulina, a concentração final de substrato (inulina), após 96 horas de cultivo, no meio de fermentação proveniente das linhagens bacterianas foi de aproximadamente 1 g/L. O meio definido para a linhagem fúngica, partiu de uma concentração inicial de inulina de 10 g/L (VANDAME & DERYCKE, 1983) e após 144 horas de cultivo, consumiu quase que totalmente o substrato (aproximadamente 9,55 g/L), conforme mostra a Figura IV.6.



**FIGURA IV. 6.** Consumo de substrato (S) em função do tempo de cultivo para as linhagens CDB 003, CDB 004, CDB 005 e DSM 2466.

A análise dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 96 horas de fermentação mostrou que a maior produção de oligômeros de frutose foi obtida pela bactéria CDB 003 (Figura IV. 7). As demais linhagens bacterianas testadas, além de apresentarem oligômeros em menor concentração, apresentaram frutose como produto da hidrólise da inulina. Deve-se ainda considerar que as manchas observadas na cromatoplaça nos pontos 1 a 6, entre a sacarose (S) e os oligômeros com grau de polimerização igual a três (DP<sub>3</sub>) são referentes a inulobiose (F<sub>2</sub>). Este dissacarídeo desejado é retido logo abaixo da sacarose. A linhagem fúngica DSM 2466, em 144 horas de fermentação, também apresentou produção de oligômeros de frutose, mas esta mostrou-se muito menos intensa, uma vez que as amostras encontravam-se aproximadamente 10 vezes mais concentradas, em relação às amostras provenientes da fermentação bacteriana.





**FIGURA IV. 7.** Cromatoplasas dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado pelos diferentes microrganismos testados, após 96 horas de fermentação:

1 a 6 – CDB 003 (1 e 4 meio, 2 e 5 branco da hidrólise, 3 e 6 hidrólise)  
 7 a 12 – CDB 004 (7 e 10 meio, 8 e 11 branco da hidrólise, 9 e 12 hidrólise)  
 13 a 18 – CDB 005 (13 e 16 meio, 14 e 17 branco da hidrólise, 15 e 18 hidrólise)  
 19 a 24 – DSM 2466 (19 e 22 meio, 20 e 23 branco da hidrólise, 21 e 24 hidrólise)  
 P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)

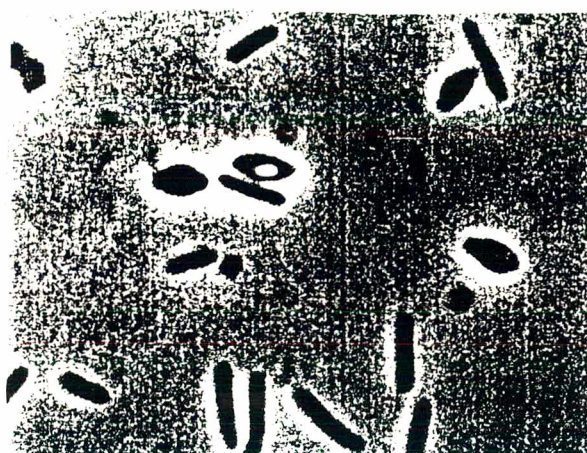
Amostras de solo próximo à raízes de plantas que contém inulina são fontes comuns de microrganismos produtores de endo-inulinasas (VANDAMME & DERYCKE, 1983). O microrganismo CDB 003 foi isolado do solo próximo a bulbos de dália e parcialmente identificado pela DSM como uma espécie rara de *Paenibacillus* sp.

As células têm forma de bastonete (Figura IV. 8), apresentando cerca de 0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$  de largura por 2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, com esporos ovais e pertencem ao grupo dos *Bacillus circulans*.

Bactérias do gênero *Bacillus* são mais comunmente reportadas como produtoras de inulina-frutotransferase para obtenção de ciclo-inulossacarídeos (UCHIYAMA *et al.*, 1973; YOKOTA *et al.*, 1991; KAWAMURA *et al.*, 1988). Até o presente momento, apenas um relato sobre produção de endo-inulinase por *Bacillus* sp. foi encontrado na literatura (NORIINSHO; NIPPON-DENPUN, 1987).

A maioria dos relatos sobre produção de endo-inulinase envolve linhagens fúngicas, que apesar de apresentarem geralmente uma considerável produção da enzima, secretam no meio de cultura uma mistura de exo- e endo-inulinase, sendo necessário uma etapa de separação destas enzimas (AZHARI, *et al.*, 1989). Aparentemente, o microrganismo isolado CDB 003 produziu somente endo-inulinase, o que representa uma vantagem sobre os demais microrganismos testados por eliminar a etapa de separação.

Além de produzir uma maior concentração da enzima desejada e não produzir exo-inulinase, outra razão para a escolha do microrganismo CDB 003 (*Paenibacillus* sp.), consiste no fato de que microrganismos termotolerantes são de grande importância nos processos biotecnológicos. O uso de inulinases provenientes de microrganismos com esta característica é promissor porque temperaturas elevadas proporcionam uma alta solubilidade da inulina, o principal fator limitante na obtenção de altas taxas de conversão em baixas temperaturas.

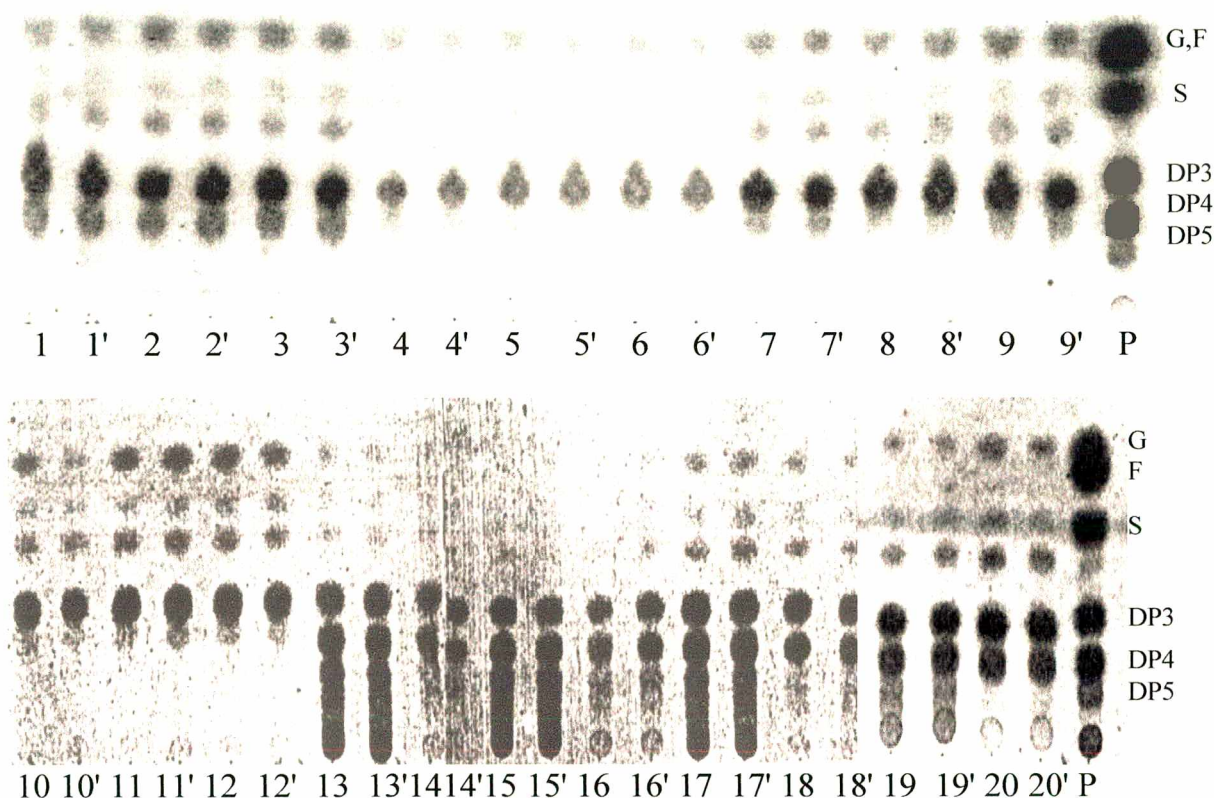


**FIGURA IV. 8.** Células de *Paenibacillus* sp.

#### **IV.4. Otimização do teste de hidrólise enzimática da inulina**

A análise dos produtos da hidrólise da inulina por TLC (Figura IV. 9) mostrou que a incubação substrato:enzima na proporção 1:2 leva a uma maior formação dos produtos se comparada à proporção 1:5. Quanto à temperatura de incubação, não foram observadas diferenças significativas entre os produtos da hidrólise quando utilizou-se 40, 50 ou 60°C. Definiu-se, então, a temperatura de 50°C para dar seqüência aos trabalhos, uma vez que esta já estava sendo utilizada nos trabalhos anteriores. O melhor tempo de incubação ficou definido como 5 horas, uma vez que 1 e 2,5 horas forneceram oligômeros de frutose de alto peso molecular. Com 5, 8 e 24 horas de incubação, prevaleceram oligômeros de frutose com grau de polimerização entre 3 e 5 ( $F_3$ ,  $F_4$  e  $F_5$ ), não havendo diferença significativa entre os resultados obtidos com estes três tempos.





**FIGURA IV. 9.** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado (96 horas) pelo microrganismo CDB 003, em diferentes tempos, temperaturas e proporções enzima:substrato:

1, 2, 3 – 40,50 e 60<sup>0</sup>C respectivamente, 8 horas, 1:2  
 4, 5, 6 – 40,50 e 60<sup>0</sup>C respectivamente, 8 horas, 1:5  
 7, 8, 9 – 40,50 e 60<sup>0</sup>C respectivamente, 24 horas, 1:2  
 10, 11, 12 – 40,50 e 60<sup>0</sup>C respectivamente, 24 horas, 1:5  
 13, 14 – 1:2 e 1:5 respectivamente, 40<sup>0</sup>C, 1 hora  
 15, 16 – 1:2 e 1:5 respectivamente, 50<sup>0</sup>C, 1 hora  
 17, 18 – 1:2 e 1:5 respectivamente, 60<sup>0</sup>C, 1 hora  
 19, 20 – 1:2, 50<sup>0</sup>C, 2.5 e 5 horas respectivamente  
 P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)  
 " - replicata

#### IV. 5. Definição do meio de cultivo

O aumento da produtividade de um processo fermentativo pode ser alcançado pela mudança de alguns parâmetros físico-químicos e nutricionais do processo no qual o microrganismo está envolvido. A formulação de meios contendo nutrientes naturais e complexos geralmente é preferido para fermentações em larga escala. No entanto, na

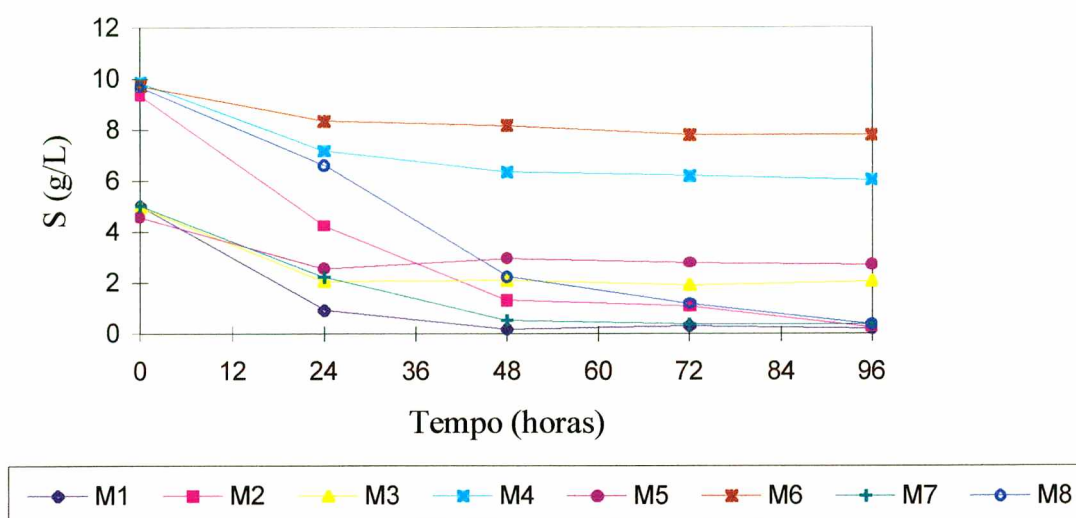
formulação inicial do meio em processo batelada, experimentos utilizando um meio mínimo foram realizados para elucidar a influência da concentração da fonte de carbono, de alguns constituintes do meio e da agitação sobre o consumo de substrato e produção da enzima, conforme descrito no item III. 2. 5.

Observando a Tabela IV. 3, pôde-se concluir que nos meios onde o ácido succínico encontrava-se em maior concentração (M1, M2, M7 e M8), o pH manteve-se próximo do valor inicial ao longo da fermentação. Já nos meios onde a concentração de ácido succínico era menor (M3, M4, M5 e M6), o pH decresceu em pelo menos 2 pontos. Uma hipótese que pode ser formulada é que o ácido succínico exerce um poder tamponante no meio de cultivo.

**TABELA IV. 3.** pH inicial e final dos diferentes meios de cultivo avaliados (M1 a M8).

MEIO	pH inicial	pH final (96 horas)
M1	6.53	6.64
M2	6.51	6.38
M3	6.52	4.49
M4	6.53	4.46
M5	6.58	3.86
M6	6.5	3.87
M7	6.56	6.56
M8	6.59	5.80

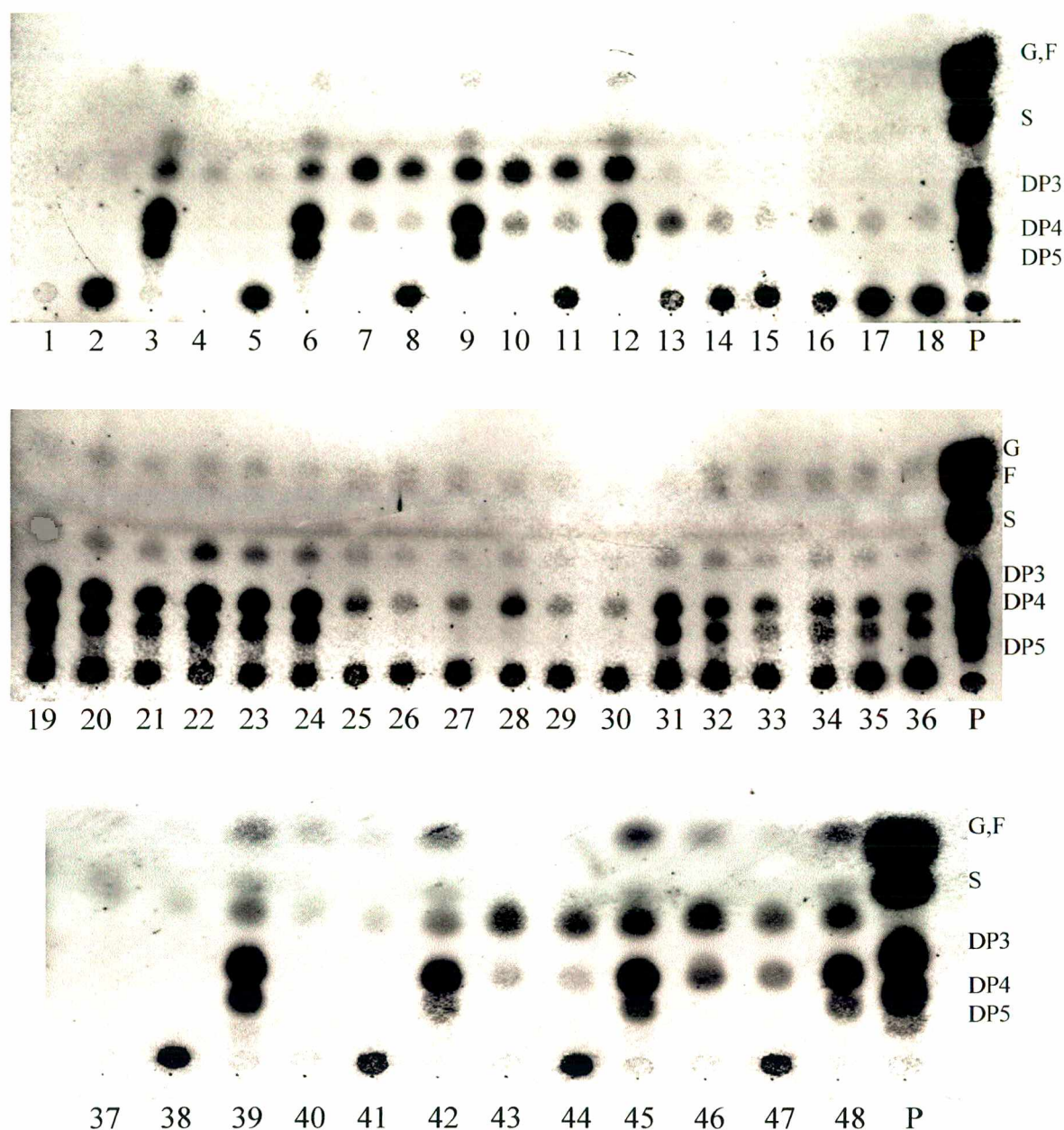
Quanto ao consumo de substrato, apenas nos meios onde o pH se manteve aproximadamente constante, o substrato foi totalmente consumido em 48 horas. Nos demais meios, mesmo em 96 horas de fermentação ainda havia substrato residual (Figura IV.10).



**FIGURA IV. 10.** Consumo de substrato ( $S$ ) em função do tempo de cultivo nos diferentes meios de cultivo testados (M1 a M8).

Pela análise dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de fermentação (Figura IV. 11), pôde-se observar que a maior produção de oligômeros de frutose é obtida quando os meios M1, M2, M7 e M8 são utilizados.





**FIGURA IV. 11** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de fermentação dos diferentes meios de cultivo testados:

1 a 6 – M1 (1 e 4 meio, 2 e 5 branco da hidrólise, 3 e 6 hidrólise)  
 7 a 12 – M2 (7 e 10 meio, 8 e 11 branco da hidrólise, 9 e 12 hidrólise)  
 13 a 18 – M3 (13 e 16 meio, 14 e 17 branco da hidrólise, 15 e 18 hidrólise)  
 19 a 24 – M4 (19 e 22 meio, 20 e 23 branco da hidrólise, 21 e 24 hidrólise)  
 25 a 30 – M5 (25 e 28 meio, 26 e 29 branco da hidrólise, 27 e 30 hidrólise)  
 31 a 36 – M6 (31 e 34 meio, 32 e 35 branco da hidrólise, 33 e 36 hidrólise)  
 37 a 42 – M7 (37 e 40 meio, 38 e 41 branco da hidrólise, 39 e 42 hidrólise)  
 43 a 48 – M8 (43 e 46 meio, 44 e 47 branco da hidrólise, 45 e 48 hidrólise)  
 P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)

O planejamento fatorial fracionado possibilitou o estudo do efeito da concentração de quatro constituintes do meio de cultura e da agitação utilizada, sobre o consumo de inulina e produção da enzima, em dois níveis, conforme descrito na Tabela IV. 4.

**TABELA IV. 4.** Variáveis estudadas aos níveis + e - (concentração de inulina, de extrato de levedura, de sulfato de amônio, de ácido succínico e frequência de agitação).

VARIÁVEIS	NÍVEL	
	+	-
A - [INULINA]	1%	0.5%
B -[EXTRATO DE LEVEDURA]	0.25%	0.05%
C - [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	0.9%	0.09%
D - [ÁCIDO SUCCÍNICO]	0.1%	0.01%
E - AGITAÇÃO	220 min <sup>-1</sup>	160 min <sup>-1</sup>

O plano experimental utilizado, juntamente com os resultados obtidos quanto ao consumo de substrato (inulina consumida) e a produção de enzima em 48 horas de fermentação, são mostrados na Tabela IV. 5.

**TABELA IV. 5.** Plano experimental utilizado e resultados obtidos em termos de consumo de inulina e produção da enzima para os meios M1 a M8.

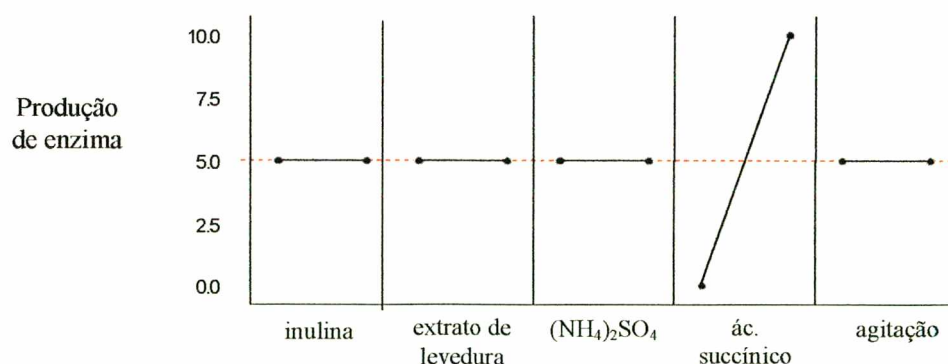
Meios	Variáveis					Inulina Consumida (g/L)	Produção de Enzima
	A	B	C	D	E		
M1	-	-	-	+	-	4,83	10
M2	+	-	-	+	+	8,01	10
M3	-	+	-	-	+	2,91	0
M4	+	+	-	-	-	3,53	0
M5	-	-	+	-	+	1,64	0
M6	+	-	+	-	-	1,58	0
M7	-	+	+	+	-	4,46	10
M8	+	+	+	+	+	7,41	10

Os valores de produção de enzima foram obtidos a partir da observação visual das cromatoplasmas dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 de fermentação dos diversos meios testados, sendo atribuídos valores de 0, 5 e 10 para nenhuma, regular ou boa produção de enzima, respectivamente.

Os valores dos efeitos principais e de interação entre as variáveis testadas, sobre o consumo de substrato e a produção de enzima estão representados na Tabela IV. 6. e Figuras IV. 12 e IV. 13.

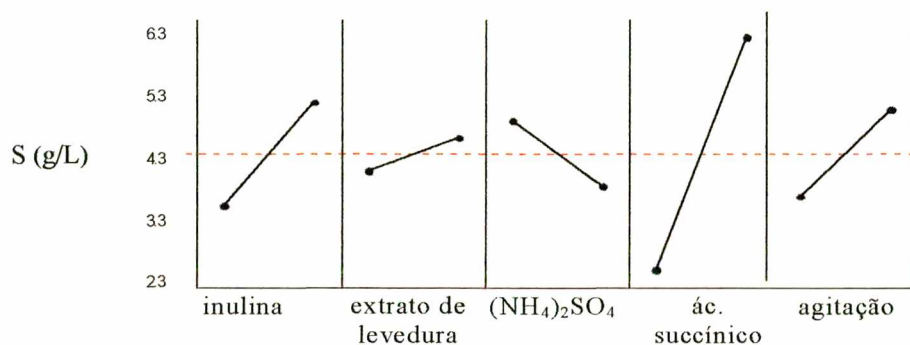
**TABELA IV. 6.** Valores dos efeitos principais e de interação entre as variáveis testadas, sobre o consumo de substrato e a produção de enzima, após 48 horas de fermentação.

Variáveis	Efeito (Produção de enzima/)	Efeito (Inulina consumida)
A - [INULINA]	0	1,69
B - [EXTRATO DE LEVEDURA]	0	0,55
C - $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0	-1,06
D - [ÁCIDO SUCCÍNICO]	10	3,77
E - AGITAÇÃO	0	1,40



**FIGURA IV. 12.** Gráfico dos efeitos principais das variáveis testadas (concentração de inulina, extrato de levedura, sulfato de amônio, ácido succínico e frequência de agitação) sobre a produção de enzima, após 48 horas de cultivo da cepa CDB 003.





**FIGURA IV. 13.** Gráfico dos efeitos principais das variáveis testadas (concentração de inulina, extrato de levedura, sulfato de amônio, ácido succínico e frequência de agitação) sobre o consumo de substrato (S), após 48 horas de cultivo da cepa CDB 003.

De acordo com os efeitos obtidos para a produção de enzima (Tabela IV. 6 e Figura IV. 12), apenas o ácido succínico apresentou um efeito positivo significativo. Presume-se que a importância deste componente no meio de cultivo esteja relacionada com a manutenção do pH no meio de cultivo. Nos meios onde o ácido succínico não estava presente, a queda acentuada no pH pode ter impossibilitado a produção da enzima ou então deixado-a inativa. O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi tema de estudo de alguns autores que observaram que a faixa de pH ideal para a ativação da enzima encontra-se entre 4.0 e 7.0 (PATENTE: MITSUI-TOATSU, 1987; ONODERA E SHIOMI, 1988; XIAO *et al.*, 1989; NAKAMURA *et al.*, 1978; PATENTE: NORIINSHO; NIPPON-DENPUN, 1987).

Analisando os efeitos das variáveis testadas sobre o consumo de substrato (Tabela IV. 6), observa-se que apesar de todos os efeitos serem significativos, a concentração de ácido succínico foi a variável que apresentou o maior efeito positivo, indicando que sua concentração deve ser mantida no nível +.

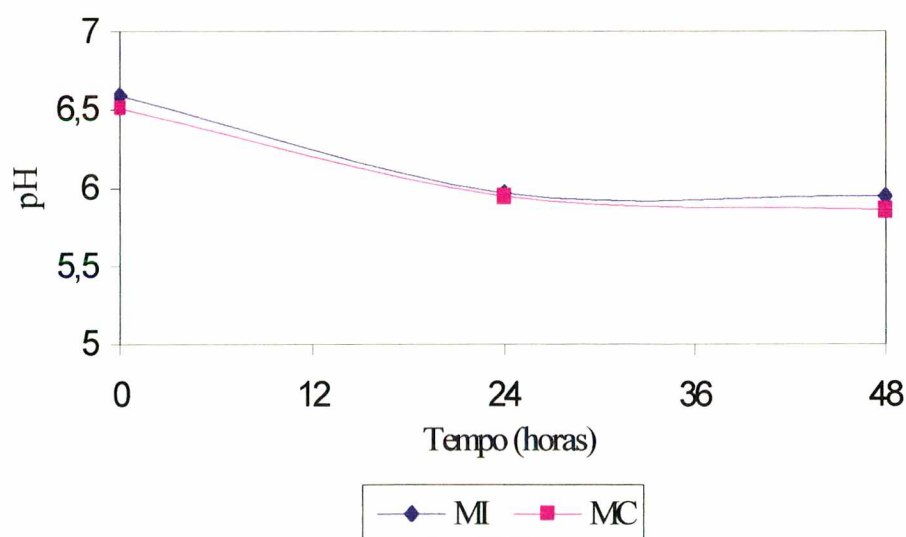
Para dar sequência aos trabalhos, definimos o meio M1 como o mais adequado, uma vez que todos os seus componentes, com exceção do ácido succínico, estão no nível menos.

#### IV. 6. Substituição da inulina comercial por extrato de chicória

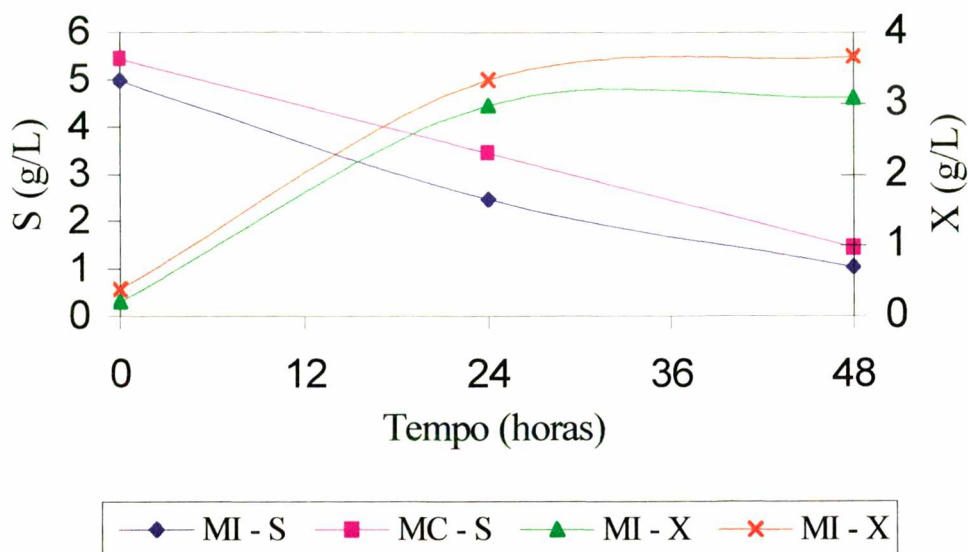
Sendo a inulina um substrato de alto custo para produção comercial de inulinase, decidiu-se avaliar neste trabalho, o uso de extrato de chicória para produção da enzima.

Baseado nos dados da literatura (BAJPAI & MARGARITIS, 1985; MANZONI & CAVAZZONI, 1988), o crescimento e a produção de enzima do microrganismo isolado CDB 003, cultivado em um meio contendo extrato de chicória (MC), foram avaliados em comparação a um meio contendo inulina comercial (MI).

As curvas de evolução do pH, crescimento celular e consumo de substrato nos meios de cultivo contendo inulina comercial (MI) e inulina proveniente do extrato de chicória (MC), apresentaram a mesma tendência, como pode ser observado através das Figuras IV. 14. e IV. 15, respectivamente.



**FIGURA IV. 14.** Evolução do pH nos meios de cultivo contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC) em função do tempo de cultivo da cepa CDB 003.



**FIGURA IV. 15.** Curvas de consumo de substrato (S) e crescimento celular (X) da cepa CDB 003 em função do tempo de cultivo, nos meios contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC).

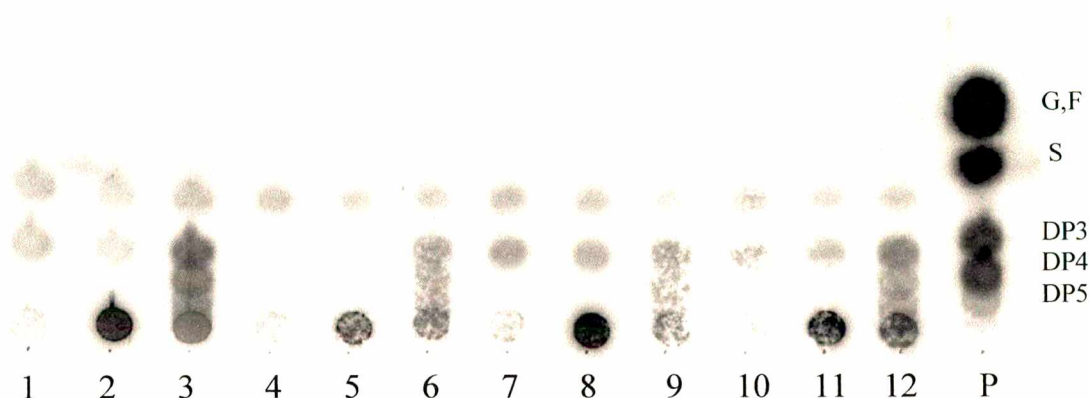
Os dados referentes ao fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em células ( $P_X$ ) estão representados na Tabela IV. 7.

**TABELA IV. 7.** Fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em células ( $P_X$ ) para os meios de cultivo contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC).

Meios	$Y_{X/S}$	$P_X$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
MI	0.73	0.06
MC	0.83	0.08

Os dados da Tabela IV. 7. mostram valores de produtividade em células e conversão de substrato em células ligeiramente superiores quando o meio contendo extrato de chicória é utilizado.

Através da análise dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de fermentação, observou-se que os resultados obtidos quando da utilização do extrato de chicória, foram similares àqueles observados no meio contendo inulina comercial (Figura IV. 16).



**FIGURA IV. 16.** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado em 48 horas de fermentação pela cepa CDB 003 nos meios contendo inulina comercial (MI) e extrato de chicória (MC):

1 a 6 - MI (1 e 4 meio, 2 e 5 branco da hidrólise, 3 e 6 hidrólise)

7 a 12 - MC (7 e 10 meio, 8 e 11 branco da hidrólise, 9 e 12 hidrólise)

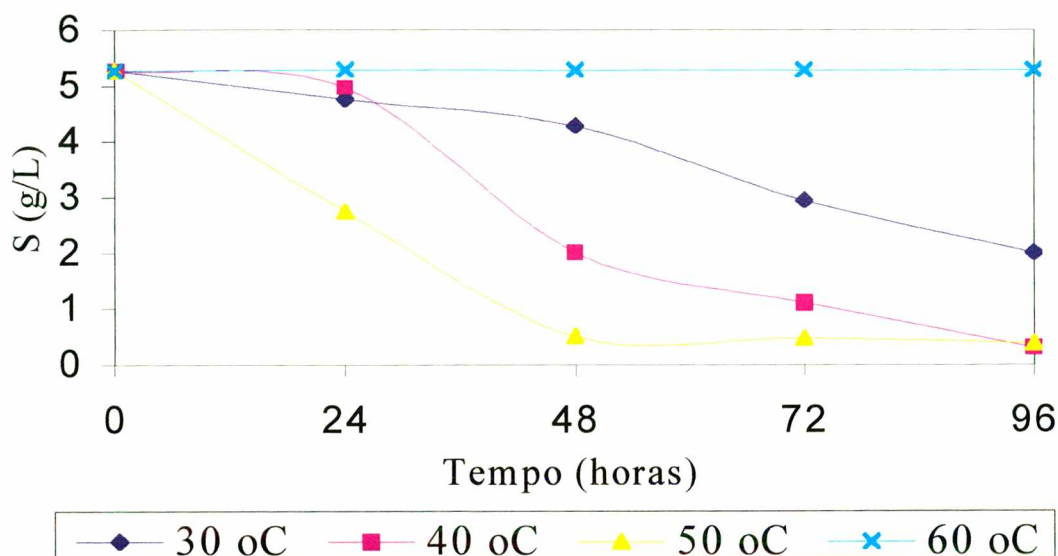
P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)

Definiu-se, então, que nos experimentos subseqüentes, o extrato de chicória passaria a ser utilizado, por se tratar de uma fonte natural de inulina, de custo inferior ao da inulina comercial.

#### IV. 7. Influência da temperatura sobre os parâmetros fermentativos

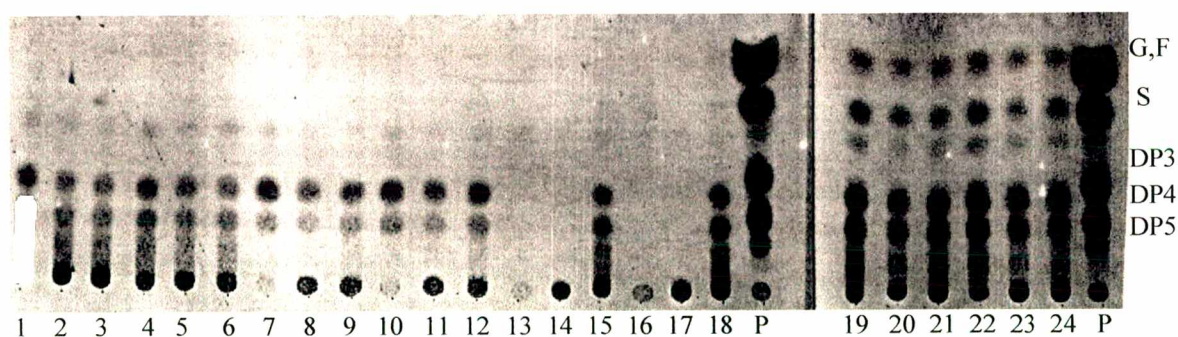
Com base na curva de consumo de substrato (Figura IV. 17), pode-se observar que na temperatura de 50°C, praticamente toda a inulina foi consumida em 48 horas. Para a temperatura de 60°C, o consumo do açúcar foi insignificante. Sabendo-se, baseado nos resultados apresentados no item IV. 4 que não se trata de inativação da enzima, conclui-se que a bactéria CDB 003 não resiste à uma temperatura tão elevada. Na temperatura de 40°C, o microrganismo mostrou-se capaz de consumir o substrato, porém após 48 horas de cultivo ainda existia 37% de substrato residual no meio, enquanto que à 30 °C, a concentração de substrato residual era de 81%.





**FIGURA IV. 17.** Curva de consumo de substrato (S) em função do tempo de cultivo da cepa CDB 003 para as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C.

A análise dos produtos de hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de fermentação (Figura IV. 18) mostrou que, nas temperaturas de 30 e 60°C, o microrganismo foi incapaz de produzir endo-inulinase. A 40°C houve uma baixa produção da enzima e os melhores resultados foram obtidos quando o cultivo foi conduzido a 50°C. Esta temperatura foi definida como ideal para a produção de endo-inulinase pela linhagem CDB 003.

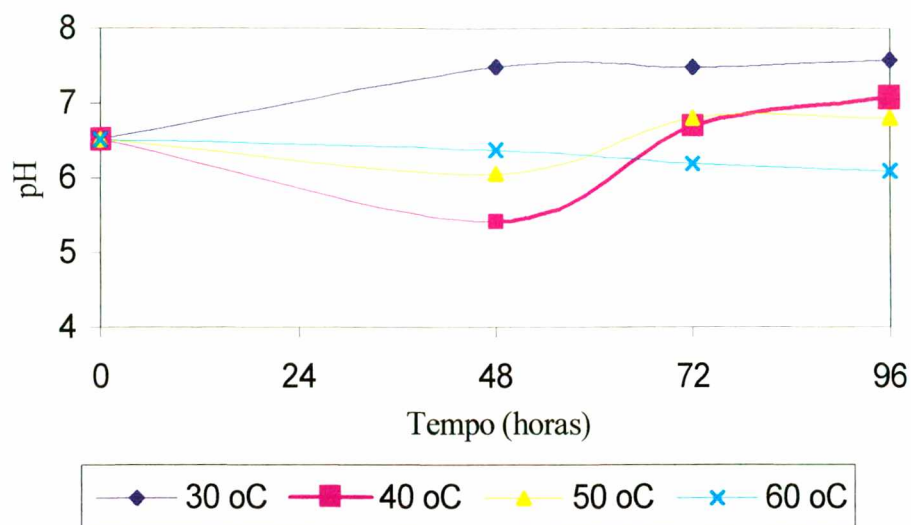


**FIGURA IV. 18** Cromatopla dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo de 48 horas de cultivo da cepa CDB 003 em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C):

- 1 a 6 - 30 °C (1 e 4 meio, 2 e 5 branco da hidrólise, 3 e 6 hidrólise)  
 7 a 12 - 40 °C (7 e 10 meio, 8 e 11 branco da hidrólise, 9 e 12 hidrólise)  
 13 a 18 - 50 °C (13 e 16 meio, 14 e 17 branco da hidrólise, 15 e 18 hidrólise)  
 19 a 24 - 60 °C (19 e 22 meio, 20 e 23 branco da hidrólise, 21 e 24 hidrólise)  
 P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)



A curva de evolução do pH para as diferentes temperaturas está mostrada na Figura IV. 19.



**FIGURA IV. 19.** Evolução do pH do meio de cultivo da cepa CDB 003 para as diferentes temperaturas testadas (30, 40, 50 e 60 °C).

Na Tabela IV. 8 estão demonstrados os valores de concentração celular inicial e final (96 horas) da linhagem CDB 003.

**TABELA IV. 8.** Valores de concentração celular inicial e final (96 horas) da linhagem CDB 003 para as diversas temperaturas testadas.

	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
X (g/L) - 0 h	0.31	0.31	0.31	0.31
X (g/L) - 96 h	6.97	7.24	7.76	1.17

A análise dos resultados apresentados na Tabela IV. 8 permite concluir que a linhagem isolada CDB 003 (*Paenibacillus* sp.) é um microrganismo termotolerante, uma vez que é capaz de crescer tanto a 30 quanto a 50 °C.

Estudos sobre o isolamento e caracterização de linhagem bacterianas termofílicas e termotolerantes produtoras de exo-inulinase foram realizados por ALLAIS *et al.* (1987), no

qual quatro linhagens foram isoladas de amostras de solo e identificadas como *Bacillus* sp. O efeito da temperatura no crescimento e produção de inulinase foi investigado para uma das cepas e verificou-se uma velocidade de crescimento constante numa faixa de temperatura entre 45 a 60 °C. Nenhum crescimento foi observado a 37 °C.

Um aspecto ecológico importante do microrganismo CDB 003, isolado do solo próximo à bulbos de dália, é a sua ocorrência em habitats que provavelmente nunca alcançam temperaturas "termofílicas" (50 a 60 °C). Estudos da distribuição de microrganismos termofílicos ao longo do gradiente de temperaturas sazonais revelaram que a temperatura ótima destes microrganismos é similar à temperatura ambiente. A questão do porque estes microrganismos são ativos em habitats "mesofílicos" permanece sem resposta (DRENT *et al.*, 1991).

A possibilidade de manter a temperatura de cultivo em 50 °C é uma grande vantagem nos processos industriais de produção de enzima uma vez que diminui o risco de possíveis contaminações e mantém a inulina solúvel no meio de cultivo.

#### IV. 8 Influência do $K_{La}$ , do pH e do íon fosfato na produção de endo-inulinase

O planejamento fatorial fracionado utilizou possibilitou o estudo de três variáveis (pH,  $K_{La}$  e concentração do íon fosfato), em dois níveis (+ e -), com a realização de quatro experimentos, conforme descrito na Tabela IV. 9.

**TABELA IV. 9** Variáveis estudadas (pH,  $K_{La}$  e  $PO_4^{=}$ ) aos níveis + e -.

VARIÁVEIS	NÍVEL	
	+	-
A - $K_{La}$	60 h <sup>-1</sup>	30 h <sup>-1</sup>
B - pH	6.5	5.5
C - $[PO_4^{=}]$	4 mM	0

O plano experimental utilizado, juntamente com os resultados obtidos quanto a atividade enzimática em 48 horas de fermentação, são mostrados na Tabela IV. 10.

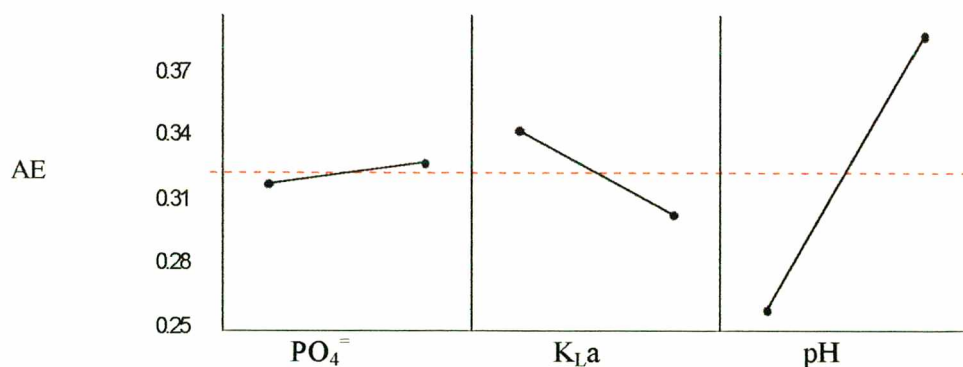
**TABELA IV. 10.** Plano experimental utilizado e atividade enzimática observada em 48 horas de fermentação para os experimentos 1 a 4.

Experimento	$K_{La}$	pH	$[PO_4^-]$	AE (U/mL)
EXP 1	-	+	-	0,40
EXP 2	-	-	+	0,28
EXP 3	+	-	-	0,23
EXP 4	+	+	+	0,37

Os valores dos efeitos principais das variáveis testadas, sobre a atividade enzimática, estão representados na Tabela IV. 11 e Figura IV. 20.

**TABELA IV. 11.** Valores dos efeitos principais das variáveis testadas, sobre a atividade enzimática.

Variáveis	Efeito
$K_{La}$	-0.04
pH	0.13
$[PO_4^-]$	0.01

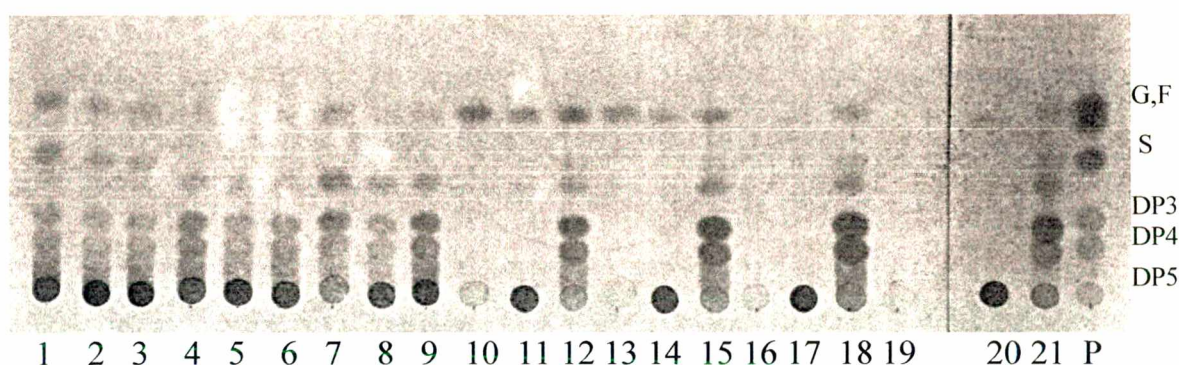


**FIGURA IV. 20.** Gráfico dos efeitos principais das variáveis testadas ( $K_{La}$ , pH e  $PO_4^-$ ) sobre a atividade enzimática, após 48 horas de cultivo da cepa CDB 003.



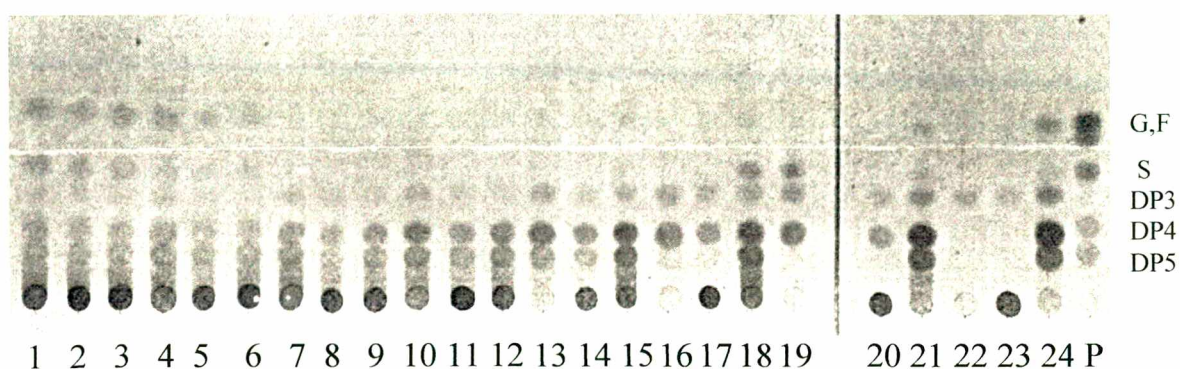
Analisando os valores dos efeitos de cada variável testada sobre a atividade enzimática, mostrados na Tabela IV. 11 e Figura IV. 20, pode-se concluir que apenas o pH do meio de cultivo tem um efeito positivo significativo, devendo ser mantido no nível + (6.5). As demais variáveis ( $K_L$  e  $PO_4$ ), por apresentarem efeitos pouco significativos, podem ser mantidos no nível -.

As cromatoplasas ilustradas nas Figuras IV. 21A, IV. 21B, IV. 21C e IV. 21D, mostram que nas condições utilizadas nos experimentos 1 e 4, a produção da enzima se deu no menor tempo (aproximadamente 15 horas) não havendo diferença significativa quanto à produção de enzima quando as condições do experimento 1 ou 4 são utilizadas.



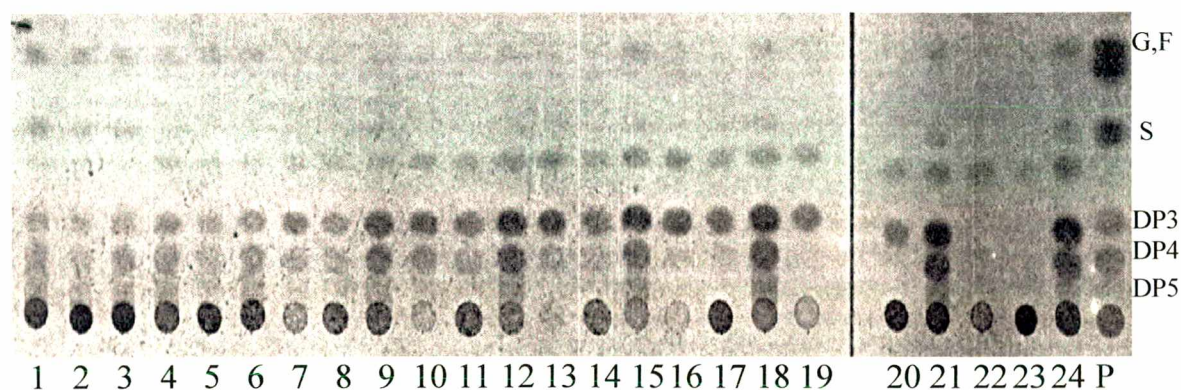
**FIGURA IV. 21A.** Cromatoplasa dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado após diferentes tempos de cultivo - experimento 1:

- 1 a 3 - 7 horas (1 meio, 2 branco da hidrólise, 3 hidrólise)
- 4 a 6 - 10 horas (4 meio, 5 branco da hidrólise, 6 hidrólise)
- 7 a 9 - 12 horas (7 meio, 8 branco da hidrólise, 9 hidrólise)
- 10 a 12 - 16 horas (10 meio, 11 branco da hidrólise, 12 hidrólise)
- 13 a 15 - 20 horas (13 meio, 14 branco da hidrólise, 15 hidrólise)
- 16 a 18 - 24 horas (16 meio, 17 branco da hidrólise, 18 hidrólise)
- 19 a 21 - 48 horas (19 meio, 20 branco da hidrólise, 21 hidrólise)
- P - padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)



**FIGURA IV. 21B.** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado após diferentes tempos de cultivo - experimento 2:

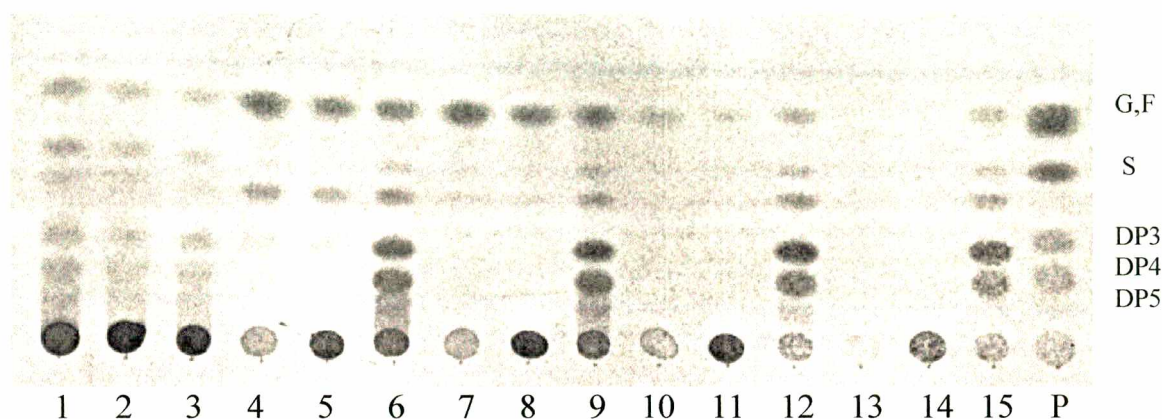
1 a 3 - 6 horas (1 meio, 2 branco da hidrólise, 3 hidrólise)  
 4 a 6 - 8 horas (4 meio, 5 branco da hidrólise, 6 hidrólise)  
 7 a 9 - 10 horas (7 meio, 8 branco da hidrólise, 9 hidrólise)  
 10 a 12 - 12 horas (10 meio, 11 branco da hidrólise, 12 hidrólise)  
 13 a 15 - 15 horas (13 meio, 14 branco da hidrólise, 15 hidrólise)  
 16 a 18 - 20 horas (16 meio, 17 branco da hidrólise, 18 hidrólise)  
 19 a 21 - 24 horas (19 meio, 20 branco da hidrólise, 21 hidrólise)  
 22 a 24 - 48 horas (22 meio, 23 branco da hidrólise, 24 hidrólise)  
 P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)



**FIGURA IV. 21C.** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado após diferentes tempos de cultivo - experimento 3:

1 a 3 - 6 horas (1 meio, 2 branco da hidrólise, 3 hidrólise)  
 4 a 6 - 8 horas (4 meio, 5 branco da hidrólise, 6 hidrólise)  
 7 a 9 - 10 horas (7 meio, 8 branco da hidrólise, 9 hidrólise)  
 10 a 12 - 12 horas (10 meio, 11 branco da hidrólise, 12 hidrólise)  
 13 a 15 - 16 horas (13 meio, 14 branco da hidrólise, 15 hidrólise)  
 16 a 18 - 21 horas (16 meio, 17 branco da hidrólise, 18 hidrólise)  
 19 a 21 - 24 horas (19 meio, 20 branco da hidrólise, 21 hidrólise)  
 22 a 24 - 48 horas (22 meio, 23 branco da hidrólise, 24 hidrólise)  
 P – padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)

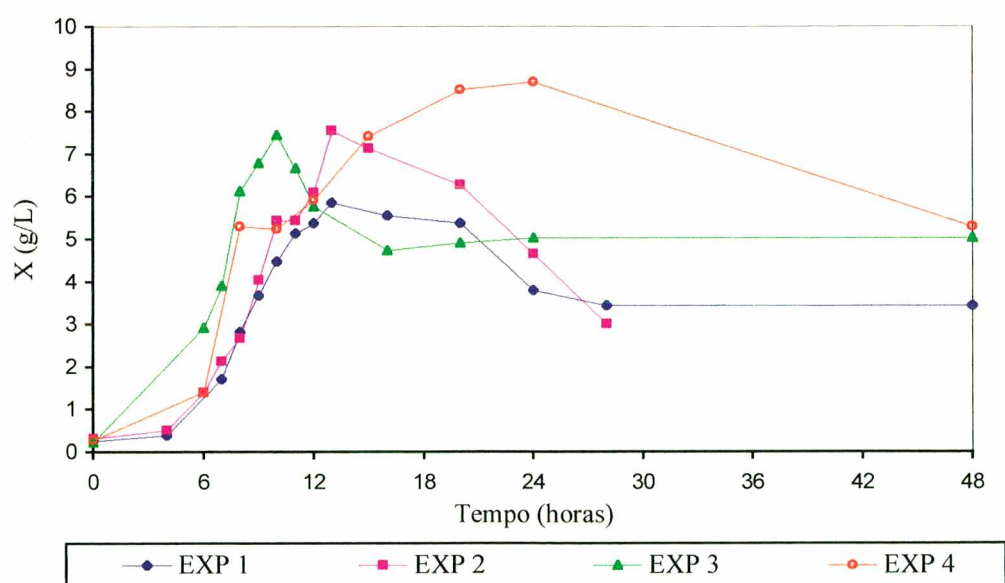




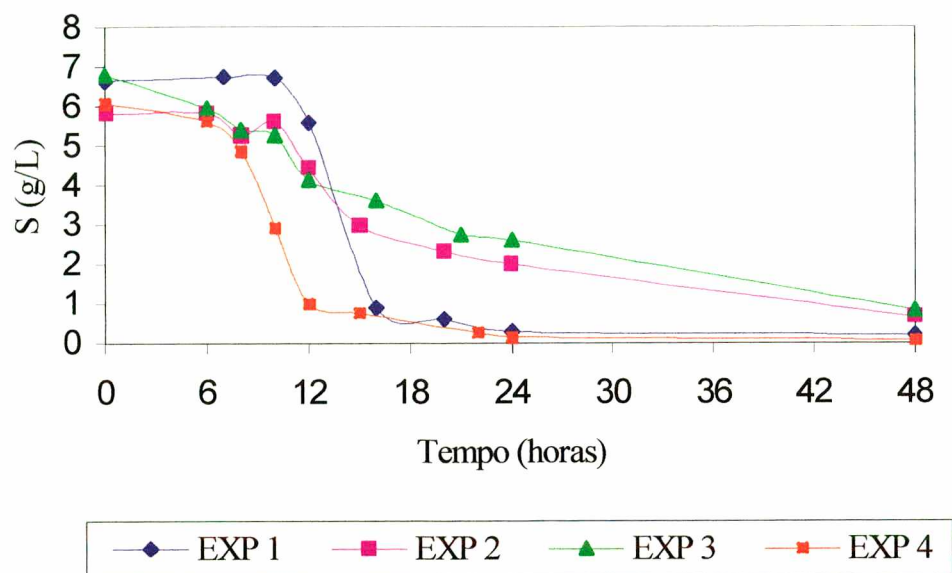
**FIGURA IV. 21D.** Cromatoplaça dos produtos da hidrólise da inulina pelo caldo fermentado após diferentes tempos de cultivo - experimento 4:

1 a 3 - 6 horas (1 meio, 2 branco da hidrólise, 3 hidrólise)  
 4 a 6 - 12 horas (4 meio, 5 branco da hidrólise, 6 hidrólise)  
 7 a 9 - 15 horas (7 meio, 8 branco da hidrólise, 9 hidrólise)  
 10 a 12 - 24 horas (10 meio, 11 branco da hidrólise, 12 hidrólise)  
 13 a 15 - 48 horas (13 meio, 14 branco da hidrólise, 15 hidrólise)  
 P - padrão (0,01 g/mL de Neosugar, sacarose, frutose e glicose)

Por outro lado, as Figuras IV. 22 e IV. 23 mostram que o crescimento celular alcançou o valor máximo (8 g/L) e o substrato foi consumido no menor tempo (concentração inferior a 1 g/L em 12 horas de cultivo) quando as condições do experimento 4 são utilizadas.

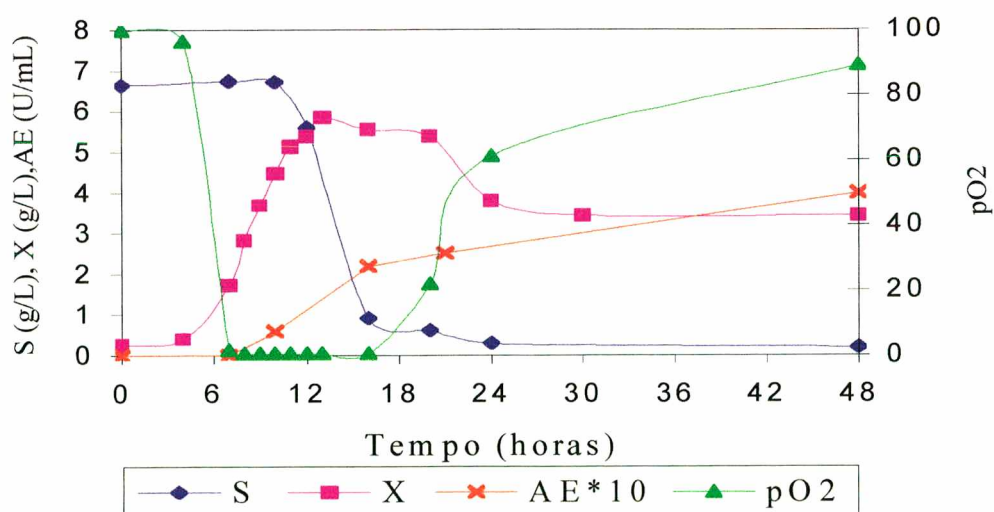


**FIGURA IV. 22.** Crescimento celular da cepa CDB 003 em função do tempo de cultivo para os experimentos 1 a 4.

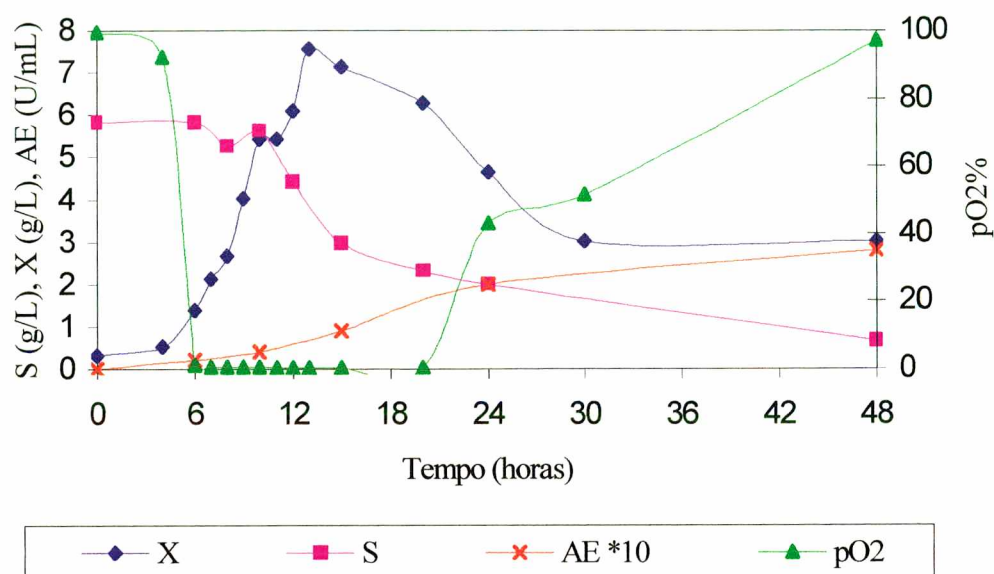


**FIGURA IV. 23.** Consumo de substrato em função do tempo de cultivo para os experimentos 1 a 4.

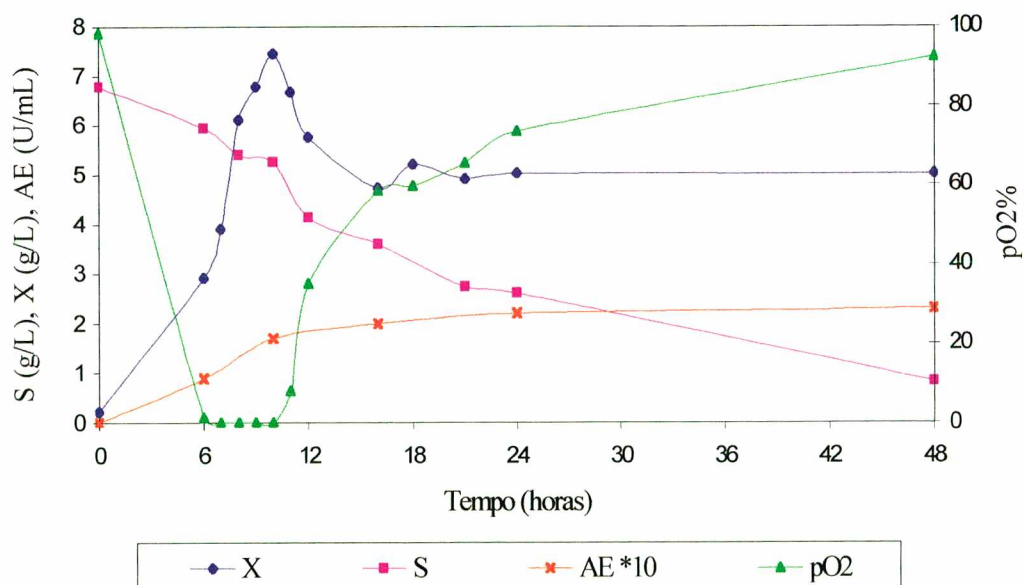
As Figuras IV. 24, IV. 25, IV. 26 e IV. 27 apresentam os perfis de consumo de substrato, crescimento celular, atividade enzimática e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo para os experimento 1, 2, 3 e 4, respectivamente.



**FIGURA IV. 24.** Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (pO<sub>2</sub>) em função do tempo de cultivo para o experimento 1.

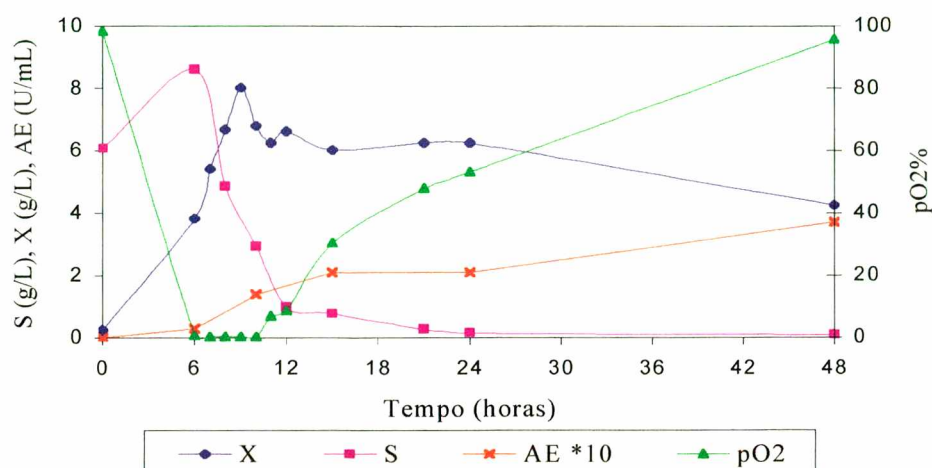


**FIGURA IV. 25.** Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ) em função do tempo de cultivo para o experimento 2.



**FIGURA IV. 26.** Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ) em função do tempo de cultivo para o experimento 3.





**FIGURA IV. 27.** Curva de consumo de substrato (S), crescimento celular (X), atividade enzimática (AE) e pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio de cultivo ( $pO_2$ ) em função do tempo de cultivo para o experimento 4.

As Figuras IV. 24, IV. 25, IV. 26 e IV. 27 mostram que, aparentemente, a produção de enzima pelo microrganismo CDB 003 é parcialmente associada ao crescimento, uma vez que a enzima continua sendo produzida mesmo na fase estacionária de crescimento. Este fato só poderia ser comprovado através da determinação da evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação do produto ( $\mu_p$ ) em função do tempo de cultivo, parâmetros estes que não puderam ser calculados devido ao número insuficiente de dados relativos ao crescimento celular e à produção de enzima na fase inicial da fermentação.

Os resultados gerais obtidos para os experimentos 1 a 4 estão ilustrados na Tabela IV. 12.

TABELA IV. 12. Resultados gerais dos experimentos 1 a 4.

Experimento	$X_{\max}$ (g/L)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$AE_{\max}$ (U/mL)	$AE_{\text{esp}}$ (U/g)	$Y_{P/S}$ (U/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$P_{AE}$ (U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
EXP 1	5,85	0,46	0,40	0,11	60	0,87	8,33
EXP 2	7,56	0,39	0,28	0,09	50	1,40	5,83
EXP 3	7,45	0,41	0,23	0,05	40	1,22	4,79
EXP 4	8,01	0,40	0,37	0,09	60	1,30	7,71

Os fatores de conversão ( $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$ ), produtividade em enzima ( $P_{AE}$ ), atividade específica ( $AE_{\text{esp}}$ ) e velocidade específica máxima de crescimento foram calculados conforme descrito nos itens III. 4. 4, III. 4. 5, III. 4. 6 e III. 4. 7, respectivamente. Os gráficos utilizados para o cálculo das velocidades específicas máxima de crescimento encontram-se no Apêndice B (B. 1, B. 2, B. 3 e B. 4).

A análise dos valores apresentados na Tabela IV. 12 permite concluir que os melhores resultados em termos de velocidade específica máxima de crescimento, atividade enzimática volumétrica máxima, atividade enzimática específica, conversão de substrato em produto e produtividade em enzima, são obtidos quando as condições do experimento 1 são utilizadas. Baseado neste e nos resultados anteriores, definiu-se que, dentre as condições avaliadas, aquelas utilizadas no experimento 1 são as mais adequadas para produção de endo-inulinase pelo microrganismo CDB 003.

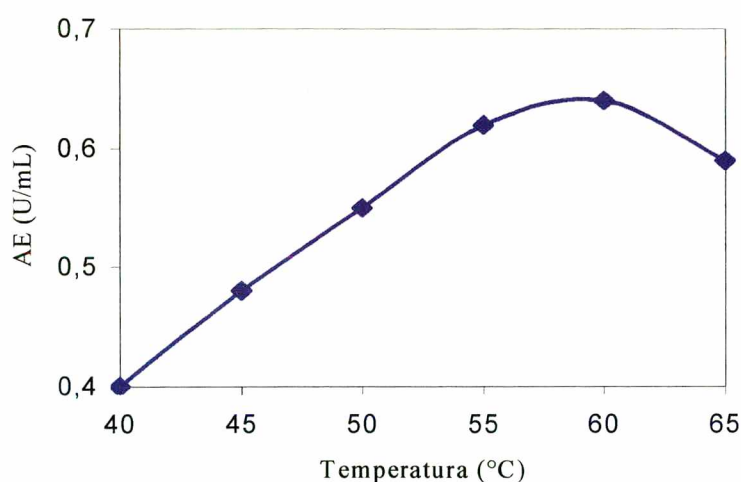
A atividade máxima de endo-inulinase encontrada no caldo fermentativo produzido por *Paenibacillus* sp. CDB 003 é muito baixa (0,40 U/mL ou 600 U<sub>total</sub>) se comparada com a atividade reportada para microrganismos como *P. purpurogenum*, 2,5 U/mL (PATENTE: MITSUI-TOATSU CHEM, 1994), *Aspergillus ficuum*, 2984,5 U (ETTALIBI & BARATTI, 1987) ou *Aspergillus niger* 817 mutante, PIA-2283 U/ml e PIB-2048 U/mL (NAKAMURA *et al.*, 1994). Por outro lado, *Streptomyces rochei* E 87, cultivado em condições ótimas, em um meio rico, apresentou atividade máxima de 1 U/mL. O mesmo microrganismo, cultivado em um meio mínimo, apresentou atividade máxima de 0,18 U/mL (YOKOTA *et al.*, 1995).

Não devemos esquecer, no entanto, que neste trabalho utilizou-se meio de cultivo mínimo, natural e de baixo custo. Além disso, a produção da enzima poderá ser ainda melhorada através da utilização de formas alternativas de condução do processo

fermentativo. Tendo em vista que a síntese da enzima mostra-se parcialmente associada ao crescimento e que pode-se, portanto, obter altas taxas de crescimento, processos com batelada alimentada e semi-contínuo, podem proporcionar aumento de produtividade.

#### IV. 9. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

O efeito da temperatura (40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C) sobre a atividade da enzima produzida pela linhagem CDB 003 foi estudado e os resultados estão demonstrados na Figura IV. 28.



**FIGURA IV. 28.** Atividade enzimática em função da temperatura de incubação da enzima.

A análise da Figura IV. 28 permite concluir que a temperatura ótima para a atividade da enzima produzida por *Paenibacillus* sp. CDB 003 está próxima a 60 °C.

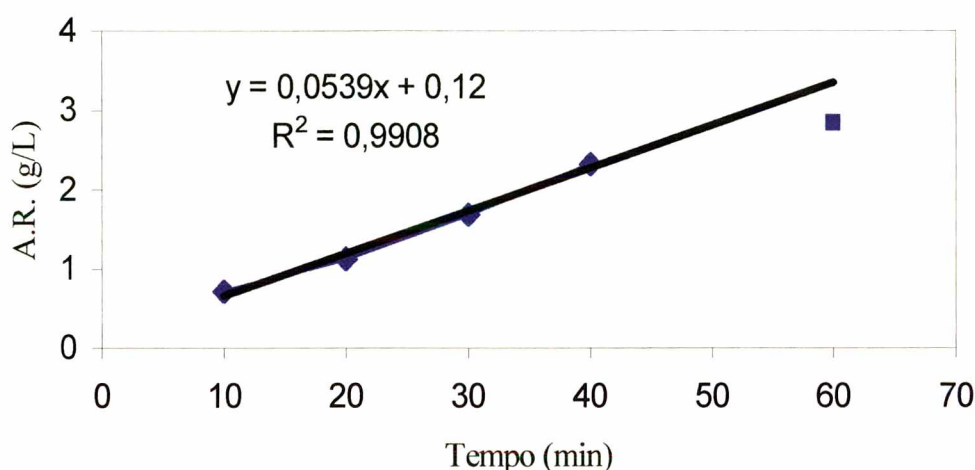
Endo-inulinasas termoestáveis, que mostram atividade ótima à 55-58°C, também são produzidas por *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium*, *Penicillium trzebinkii* (MITSUI-TOATSU, 1987) e *Aspergillus ficuum* (NORMAN E HOJER-PEDERSEN, 1989). No entanto, a maioria dos relatos sobre endo-inulinasas fúngicas citam como temperatura ótima para a atividade da enzima, 45-50 °C. Também a enzima produzida por *Bacillus* sp (KK-4645) apresenta condições ótimas para a atividade enzimática em temperatura de 40°C (NORIINSHO; NIPPON-DENPUN, 1987), temperatura esta, mais baixa do que a encontrada para *Paenibacillus* sp. CDB 003.



#### IV. 10. Efeito do tempo de incubação na formação dos inulo-oligossacarídeos

Neste experimento, a correlação entre o tempo de hidrólise da inulina (0 a 60 minutos) e a formação do inulo-oligossacarídeos foi estudada.

A Figura IV. 29 mostra a correlação entre o tempo de hidrólise da inulina e a concentração de açúcares redutores formados.



**FIGURA IV. 29.** Correlação entre o tempo de hidrólise da inulina e a concentração de açúcares redutores formados

A análise da Figura IV. 29 permite concluir que a formação de açúcares redutores é proporcional ao tempo de hidrólise da inulina até 40 minutos de reação, sendo que qualquer tempo dentro desta faixa pode ser utilizado.

#### IV. 11. Estabilidade da enzima com o tempo em diferentes temperaturas de estocagem

A estabilidade da enzima produzida pela linhagem CDB 003 estocada em freezer (-18 °C), em geladeira (4 °C) e à temperatura ambiente (TA), em função do tempo de estocagem, foi avaliada e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela IV. 13.

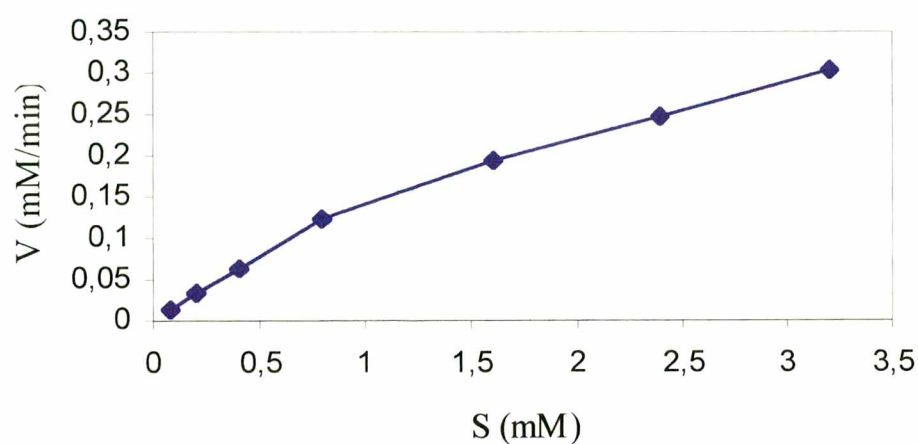
**TABELA IV. 13** Valores de atividade enzimática obtidos para diversos tempos de incubação da enzima, em diferentes temperaturas de estocagem.

Tempo (dias)	AE (U/mL)		
	-18 °C	4 °C	TA
0	1.03	1.03	1.03
5	1.00	0.98	1.03
31	0.98	1.11	1.09
52	0.92	1.03	1.01

Baseado nos dados apresentados na Tabela IV. 13, podemos afirmar que não existe diferença significativa em termos de atividade enzimática, para a enzima incubada a -18 °C, a 4 °C ou à temperatura ambiente, num período de 52 dias.

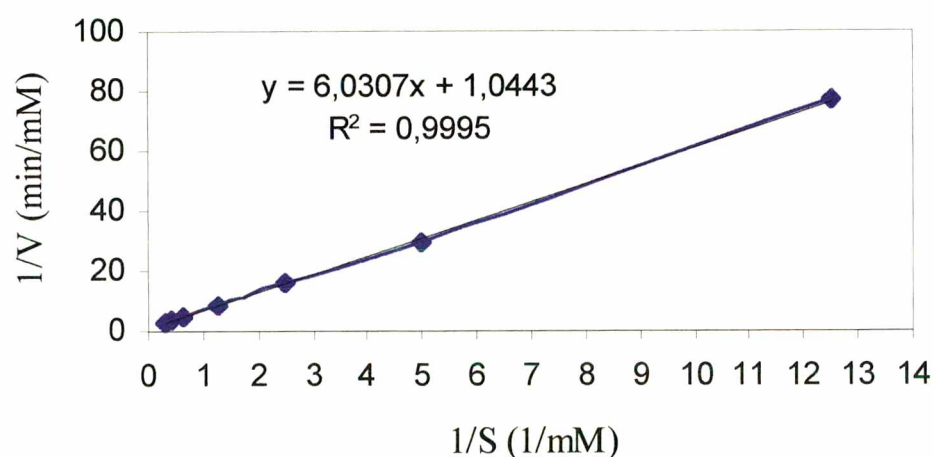
#### IV. 12. Determinação de $K_m$ e $V_{max}$

Conforme descrito no item III. 4. 8, os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram estimados através do método descrito por Lineweaver-Burk (BAILEY & OLLIS, 1986). Para tanto, plotou-se, para diferentes concentrações de substrato, a concentração de produto formado (açúcar redutor) em 30 minutos de reação. O coeficiente angular das várias retas obtidas forneceu a velocidade de reação para cada concentração de substrato testada. Normalmente, encontra-se dificuldade em determinar  $K_m$  e  $V_{max}$  devido ao perfil sigmoidal obtido no traçado da velocidade de reação em função da concentração de inulina (Figura IV. 30). GUPTA *et al* (1994) também observaram este perfil sigmoidal para exo-inulinase de *Kluyveromyces fragilis*, tendo inulina como substrato. Os autores atribuíram este comportamento à capacidade da inulinase em hidrolisar a inulina sucessivamente, em diferentes pontos da cadeia linear, liberando oligômeros de grau de polimerização menor do que o da inulina para servir como um novo substrato, resultando num aumento da velocidade de hidrólise. Este modo de ação, onde o produto torna-se substrato para subsequente ação da enzima pode levar a um comportamento não hiperbólico.



**FIGURA IV. 30.** Velocidade da reação ( $V$ ) em função da concentração de substrato ( $S$ ).

De posse dos valores obtidos, plotou-se o inverso da velocidade de reação em função do inverso da concentração de substrato (Figura IV. 31).



**FIGURA IV. 31** Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{\max}$ ) pelo método descrito por Lineweaver-Burk.

A equação da reta obtida, que forneceu os valores de  $K_m$  e  $V_{\max}$  está representada a seguir:

$$1/V = a + b 1/S \quad (1)$$

Esta equação forneceu um valor de  $K_m$  igual a 6,03 mM e  $V_{max}$  igual a 1,04 g.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. O valor de  $K_m$  é significativamente maior do que o encontrado para endo-inulinases purificadas de *Aspergillus niger*, 0,48 e 0,50 mM, (NAKAMURA *et al*, 1994), *P. purpurogenum*, 0,21 mM (ONODERA & SHIOMI, 1988) e *Aspergillus niger*, 1,25 mM. Por outro lado, ETTALIBI & BARATTI (1990), encontraram um valor de  $K_m$  igual a 10 mM para uma das endo-inulinases produzidas por *Aspergillus ficcum*.



## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As principais conclusões deste trabalho encontram-se relacionadas a seguir:

⇒ Das dezesseis linhagens fúngicas testadas na primeira etapa deste trabalho, quatro linhagens pertencentes ao gênero *Aspergillus* (*A. niger* DSM 821, *A. niger* DSM 2466, *A. ficcum* DSM 932 e *A. niger* UFPE 3042) foram por apresentarem um melhor crescimento em presença de inulina como única fonte de carbono.

⇒ Após a avaliação em fermentação submersa, das quatro linhagens fúngicas selecionadas na primeira etapa deste trabalho, selecionou-se a cepa *A. niger* DSM 2466 como melhor produtora de endo-inulinase.

⇒ Os resultados obtidos quando da comparação entre a cepa *A. niger* DSM 2466 e três linhagens bacterianas isoladas nos laboratórios do CDB (CDB 003, CDB 004 e CDB 005), revelaram que a cepa parcialmente identificada como *Paenibacillus* sp. CDB 003 apresentou os melhores resultados quanto à produção de endo-inulinase. Além de proporcionar maior atividade enzimática, este microrganismo mostrou-se capaz de produzir somente endo-inulinase, enquanto que as demais cepas apresentaram uma mistura de exo e endo-inulinase.

⇒ A análise dos produtos da hidrólise após incubação da inulina com o caldo enzimático produzido pela cepa *Paenibacillus* sp. CDB 003 em diversas temperaturas, tempos e proporções substrato/ enzima, mostrou não haver diferenças significativas entre os produtos da hidrólise quando utilizou-se 40, 50 ou 60°C. A temperatura de 50°C foi então definida para dar seqüência aos trabalhos, uma vez que já vinha sendo utilizada nos trabalhos anteriores. Quanto à proporção substrato/enzima, observou-se que a proporção 1:2 leva a uma maior formação dos produtos se comparada à proporção de 1:5. O melhor tempo de incubação ficou definido como 5 horas, uma vez que 1 e 2,5 horas forneceram oligômeros de frutose de alto peso molecular. Com 5, 8 e 24 horas de incubação, prevaleceram oligômeros de frutose com DP entre 3 e 5 (F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub>), não havendo diferenças significativos entre os resultados obtidos com estes três tempos.



⇒ A influência das concentrações de inulina, extrato de levedura, sulfato de amônio, ácido succínico, assim como da frequência de agitação sobre a produção de endo-inulinase foi avaliada em um planejamento experimental em dois níveis. Os melhores resultados, avaliados em termos do efeito das variáveis testadas sobre o consumo de substrato e a produção da enzima, foram obtidos quando o meio contendo 1% de inulina, 0,05% de extrato de levedura, 0,09% de sulfato de amônio e 0,1% de ácido succínico foi utilizado para o cultivo da cepa *Paenibacillus* sp. CDB 003, numa frequência de agitação de  $160 \text{ min}^{-1}$  (M1). De acordo com os efeitos produzidos, apenas o aumento da concentração de ácido succínico apresentou um efeito positivo significativo sobre a produção da enzima. Presume-se que a importância deste componente no meio de cultivo esteja relacionada com a manutenção do pH no meio. Nos meios onde o ácido succínico não estava presente, a queda acentuada do pH pode ter impossibilitado a produção da enzima.

⇒ Os resultados obtidos em termos de produção da enzima quando da utilização do extrato de chicória como fonte de inulina, foram similares àqueles observados com o meio contendo inulina comercial. Definiu-se, então, que o extrato de chicória passaria a ser utilizado, por tratar-se de uma fonte natural de inulina, de custo inferior ao da inulina comercial.

⇒ A influência da temperatura foi avaliada entre 30 e 60°C. Os melhores resultados, em termos de produção da enzima, foram obtidos quando o cultivo foi conduzido a 50°C.

⇒ As constantes da equação de Michaelis-Menten foram determinadas:  $K_m=6,03 \text{ mM}$  e  $V_{\max}=1,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

⇒ A influência do suprimento de oxigênio ( $K_{La}$  igual a 30 e 60  $\text{h}^{-1}$ ), do pH do meio de cultivo (5.5 e 6.5) e da concentração do íon fosfato (0 e 4mM) sobre o crescimento celular e sobre a atividade inulinolítica também foi investigada em um planejamento fatorial fracionado. Os resultados mostraram que, para as faixas de variação estudadas, somente o aumento do pH teve uma influência positiva sobre a produção de endo-inulinase, podendo as demais variáveis ser mantidas em seus níveis mais baixos ( $K_{La}$  igual a 30  $\text{min}^{-1}$  e ausência do íon  $\text{PO}_4^-$ ).

⇒ A produção de enzima pelo microrganismo *Paenibacillus* sp. CDB 003, aparentemente, mostra-se parcialmente associada ao crescimento, uma vez que a enzima continua sendo produzida mesmo na fase estacionária de crescimento. Pode-se, portanto, obter altas taxas de produção com baixas taxas de crescimento e processos com batelada alimentada e semi-contínuo pode proporcionar aumento de produtividade.

⇒ A enzima mostrou-se estável quando incubada em freezer (-18°C), geladeira (4°C) ou a temperatura ambiente, num período de 52 dias.

⇒ A temperatura ótima de atuação da enzima está próxima de 60°C.

⇒ A formação de açúcares redutores é proporcional ao tempo de hidrólise da inulina até 40 minutos de reação.

Os resultados deste trabalho levaram a uma série de questionamentos, que poderão ser abordados na continuidade deste tema:

⇒ Como aparentemente a enzima produzida por *Paenibacillus* sp. mostra-se parcialmente associada ao crescimento, pode-se obter altas taxas de produção com baixas taxas de crescimento e a utilização de processos com batelada alimentada e semi-contínuo podem proporcionar aumento de produtividade.

⇒ Experimentos visando a otimização de meios de cultivo naturais contendo água de maceração de milho (milhocina), em substituição aos sais utilizados no meio IB, podem ser conduzidos em trabalhos subseqüentes.

⇒ A avaliação da influência de outras fontes de carbono na atividade enzimática poderia elucidar a hipótese de indução da enzima.

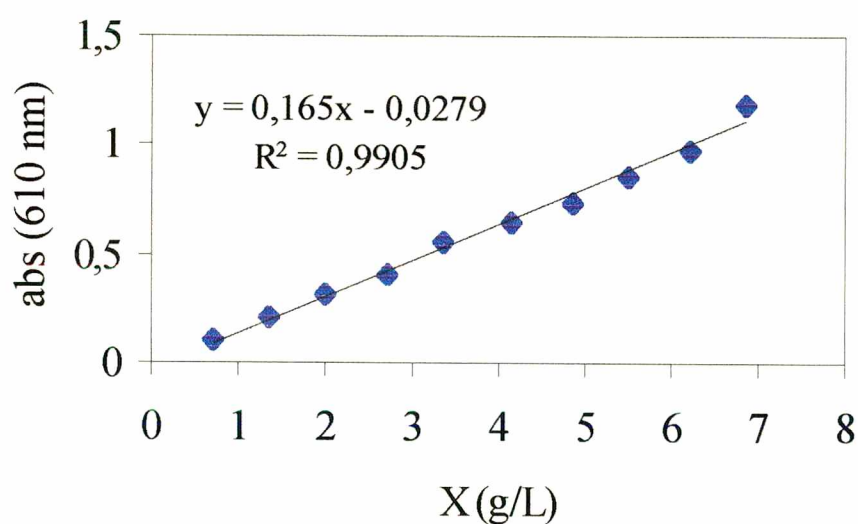
⇒ Outras características da enzima tais como, pH ótimo, estabilidade com o pH e estabilidade com a temperatura, poderão ser estudadas para melhor compreensão do processo produtivo.

## **APÊNDICE A**

### **CURVAS DE CALIBRAÇÃO**

**TABELA A. 1** Valores de absorbância de suspensões de células do microrganismo CDB 003 cultivadas em meio IB (espectrofotômetro LKB, 610 nm).

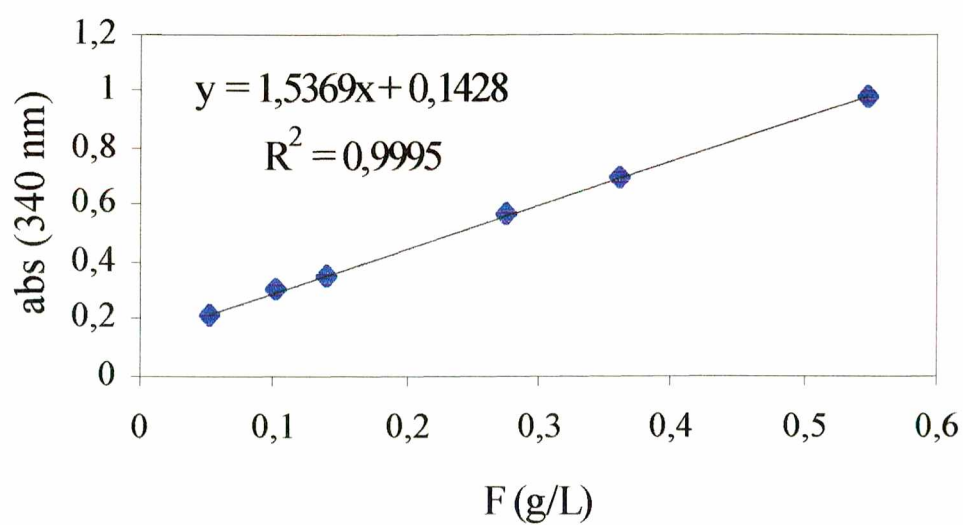
X (g/L)	0.73	1.37	2.00	2.71	3.36	4.16	4.86	5.50	6.20	6.87
ABS	0.1	0.21	0.31	0.41	0.55	0.64	0.73	0.88	0.97	1.18



**FIGURA A. 1** Curva de correlação entre concentração celular (X) e a absorbância (abs) obtida a partir de suspensões de células do microrganismo CDB 003 cultivadas em meio IB:  $X = (abs + 0.0279) / 0.165$ .

**TABELA A. 2** Valores de absorbância de soluções padrão de frutose (espectrofotômetro "Microtiter Reader", 340 nm)

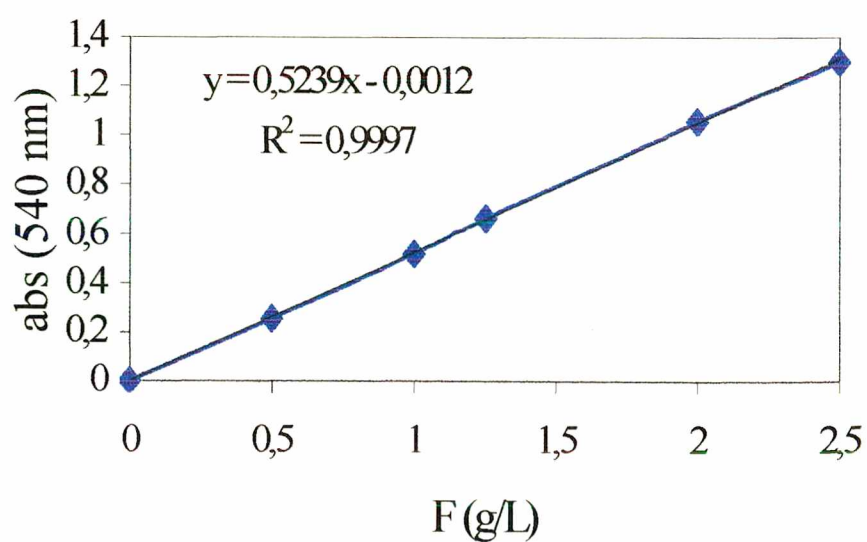
<b>F (g/L)</b>	0.052	0.101	0.139	0.276	0.362	0.548
<b>ABS</b>	0.212	0.307	0.357	0.570	0.700	0.982



**FIGURA A. 2** Exemplo de uma curva de calibração obtida no teste de determinação de glicose e frutose em Sistema "Microtiter Reader":  $[Frutose] = (abs - 0,1428) / 1,5369$

**TABELA A. 3** Valores de absorbância de soluções padrão de frutose (espectrofotômetro Shimadzu, 540 nm)

<b>F (g/L)</b>	0	0.5	1.0	1.25	2	2.5
<b>ABS</b>	0	0.2535	0.5195	0.6635	1.0545	1.3

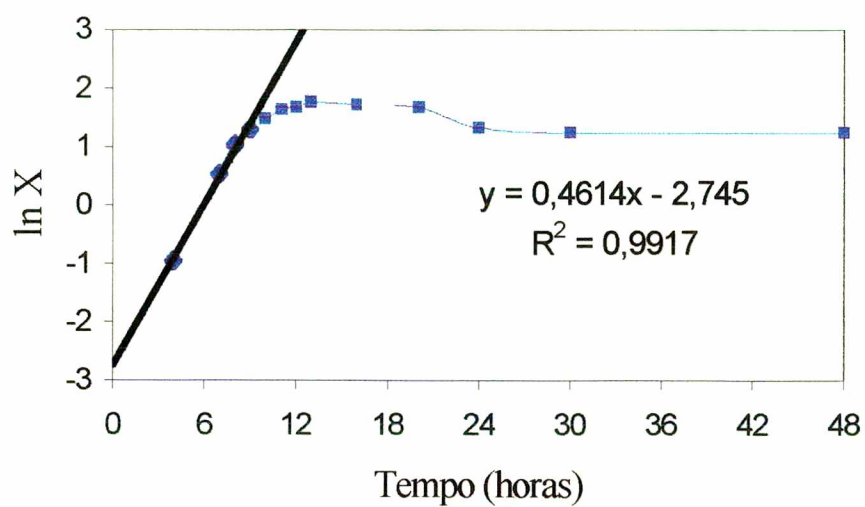


**FIGURA A. 3** Exemplo de uma curva de calibração obtida no teste de determinação de açúcares redutores pelo método DNS em espectrofotômetro Shimadzu:  $[Frutose] = (abs + 0,0012) / 0,5239$ .

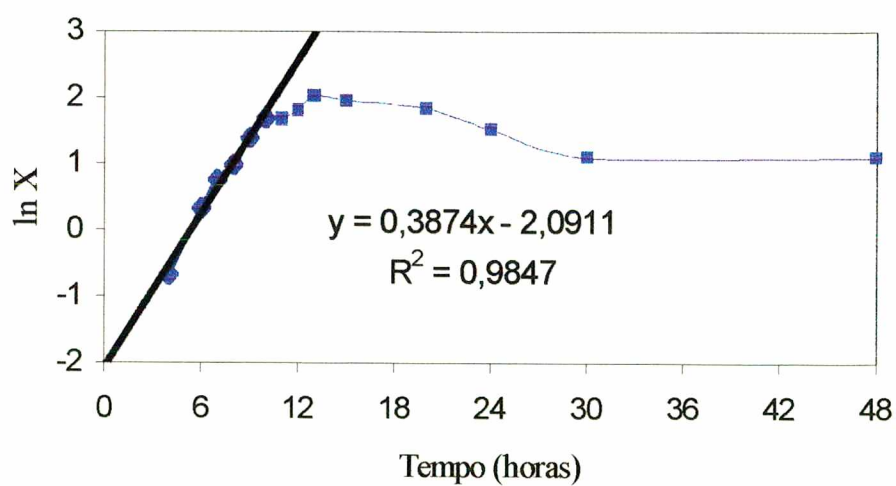


## **APÊNDICE B**

### **FIGURAS**

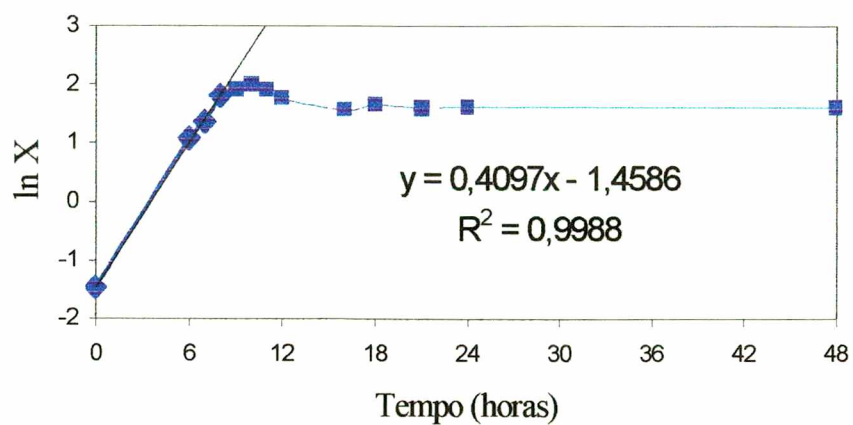


**FIGURA B.1** Determinação de  $\mu_{\max}$  pelo método logarítmico para o experimento 1.

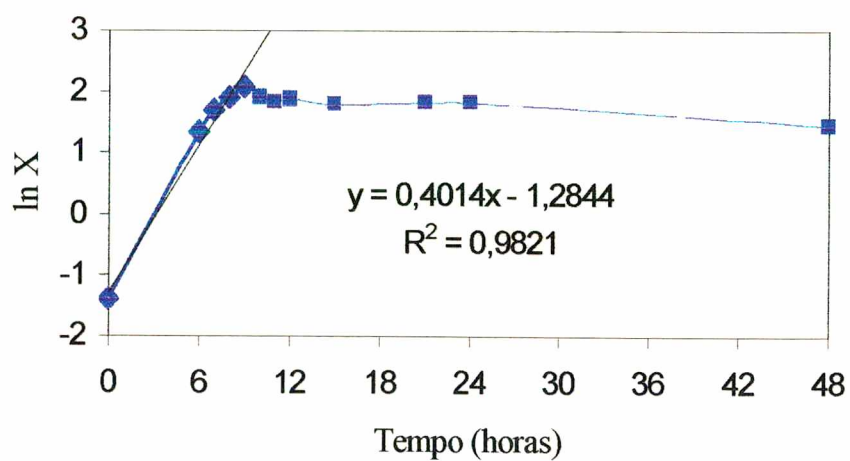


**FIGURA B.2** Determinação de  $\mu_{\max}$  pelo método logarítmico para o experimento 2.





**FIGURA B.3** Determinação de  $\mu_{\max}$  pelo método logarítmico para o experimento 3.



**FIGURA B.4** Determinação de  $\mu_{\max}$  pelo método logarítmico para o experimento 4.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIS, J.-J.; KAMMOUN, S.; BLANC, P.; GIRARD, C.; BARATTI, J.C. Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.5, p.1086-1090, 1986.
- ALLAIS, J.-J., HOYOS-LOPEZ, G., KAMMOUN, S. & BARATTI, J.C. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n.5, p.942-945, 1987.
- AZHARI, R.; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. Purification and Characterization of endo- and exo-Inulinase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.11, p.105-117, 1989.
- BACON, J.S.D. & LOXLEY, R. **Biochemistry Journal**. v.51, p.208-213, 1952. In: VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. **Fermentation Process, Properties and Applications**. Advances in Applied Microbiology, v.29, p.139-176, 1983.
- BAJPAI, P. & MARGARITIS, A. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.7, p.373-376, 1985.
- BARATTI, J. & ETTALIBI, M. Thermostable Inulinases from *Aspergillus ficuum*: Biochemical Characterization and Biotechnological Applications, p.211-216. In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983. In: ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in Kluyveromyces Yeasts**. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- BAYLEY, L.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2<sup>nd</sup>ed. Mc Graw-Hill Book Co., 1986, 984p.
- BELAMRI, M.; SASSI, A.H.; SAVART, M.; TANTAOUI-ELARAKI, A. & COTTIN, P. Purification and properties of an extracellular inulinase-like  $\beta$ -fructosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.410-413, 1994.
- BEUTLER, H.O. D-Fructose. v.6, p.321-327. In: **Methods of Enzymatic Analysis**. Ed Bergmeyer, H.U. 3<sup>rd</sup> Edition, Ed. Verlag Chemie: Weinheim - Deenfield Beach, Florida-Basel, 1984
- BORNET, F.R.J. Undigestible sugars in food products. **J. Clin. Nutr.** n.59, p.763S-769S, 1994.

- BOURGI, J.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Isolation of *Kluyveromyces fragilis* derepressed mutant hyperproducer of inulinase for ethanol production from Jerusalem artichoke. **J. Ferment. Technol.**, v.64, n.3, p.239-243, 1986.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. and HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. **John Wiley & Son - USA**. Cap. III-12, p.374-418, 1978.
- CARNITI, P.; BELTRAME, P.L.; GUARDIONE, D.; FOCHER, B.; MARZETTI, A. Hydrolysis of Inulin: A Kinetic Study os the Reaction Catalyzed by an Inulinase from *Aspergillus ficuum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.575-579, 1991.
- DE BRUYN, A., ALVAREZ, A.P., SANDRA, P. & DE LEENHEER, L. Isolation and identification of O- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2,1)-O- $\beta$ -D-fructose, a product of the enzymic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. **Carbohydrate Research**. n.235, p.303-308, 1992.
- DRENT, W.J.; LAHPOR, G.A.; WIEGANT, W.M.; GOTTSCHAL, J.C. Fermentation of Inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Various Habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.2, p.455-462, 1991.
- DREVN, T. & BORNET, F. Les fructo-oligosaccharides: ACTILIGHT®. In: Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charges dans les IAA. Ed. TEC&DOC Lavoisier, p.313-338, 1992.
- DUVNJAK, Z.; KOSARIC, N.; HAYES, R.D. Kinetics of ethanol production from Jerusalem artichoke juice with some *Kluyveromyces* species. **Biotechnology Letters**, v.3, n.10, p.589-594, 1981.
- ECHEVERRIGARAY, S. & TAVARES, F.C.A. Atividade da inulinase em leveduras e fermentações de extrato de *Helianthus tuberosus* L. **Rev. Microbiol.**, SP, v.16, n.2, p.127-131, 1985.
- EFSTATHIOU, I.; REYSSET, G.; TRUFFAUT, N.A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.143-149, 1986.
- ELYACHIOUI, M.; HORNEZ, J.P. & TAILLIEZ, R. General properties of extracellular bacterial inulinase. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 514-519, 1992.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.26, p.13-20, 1987.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Molecular and Kinetic Properties of *Aspergillus ficuum* Inulinases. **Agric. Biol. Chem.**, v.54, n.1, p.61-68, 1990.

- FUCHS, A.; DE BRUIJN, J.M.; NIEDEVELD, C.J. Bacteria and yeasts as possible candidates for the production of inulinases and levanases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.51, p.333-351, 1985.
- FUCHS, A. Perspectives of Inulin and Inulin-Containing Crops in the Netherlands and in Europe. Proceeding of the 3<sup>rd</sup> Seminar on Inulin. **International Agricultural Centre**, p.80-102, Wageningen, Holanda, 1<sup>st</sup> March, 1989.
- FUCHS, A. Current and potential food and non-food applications of fructans. **Biochemical Society Transactions**, p. 555-560, 1991.
- GIBSON, G. R & WANG, X. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. **Microbiol Letters**. N. 118, p. 121-128, 1994.
- GROOTWASSINK, J.W.D. & FLEMING, S.E. Non-specific  $\beta$ -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.2, p.45-53, 1980.
- GROOTWASSINK, W.D. & HEWITT, G.M. Inducible and Constitutive Formation of  $\beta$ -fructofuranosidase (inulase) in batch and Continuous Cultures of the Yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, v.129, p.31-41, 1983.
- GUIRAUD, J.P.; DAURELLES, J.; GALZY, P. Alcohol production from Jerusalem artichoke using yeasts with inulinase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.XXIII, p.1461-1465, 1981.
- GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Inulin Conversion by Yeasts, p.255-296. In: VERACHTERT, H. & DE MOT, R. **Yeast, Biotechnology and Biocatalysis**. v.5. Catholic University of Leuven, Belgium, 1989, 521p.
- GUPTA, A.K.; NAGPAL, B.; KAUR, N.; SINGH, R. Mycelial and extracellular inulinases from *Fusarium oxysporum* grown on aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. **J. Chem. Tech. Biotechnology**, v.42, p.69-76, 1988.
- GUPTA, A.K.; KAUR, N.; SINGH, R. Fructose and Inulinase Production from Waste *Cichorium intybus* Roots. **Biological Wastes**, v.29, p.73-77, 1989.
- GUPTA, A.K.; RATHORE, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Thermal Stability and Immobilization of Inulinase from *Fusarium oxysporum*. **J. Chem. Tech. Biotechnology**, v.47, p.245-257, 1990.
- GUPTA, A.K., JAIN, H., KAUR, N. & SINGH, R. Regulation of Activity and Properties of Inulinases from Roots of *Cichorium intybus* L. p.205-210. In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.

- GUPTA, A.K.; GILL, A.; KAUR, N.; SINGH, R. High Thermal Stability of Inulinases from *Aspergillus* species. **Biotechnology Letters**, v.16, n.7, p.733-734, 1994.
- HARAGUCHI, K.; HAYASHI, K. & KASUMI, T. Purification and Properties of Inulinase from *Arthrobacter globiformis* S64-1. **starch/stärke**, v. 42, n.1, p.28-30, 1990.
- HIDAKA, H. Neosugar - manufacturing and properties. **Proc. 1. Neosugar Res. Conf.**, Tokyo. Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokyo, p.3-13, 1982.
- HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKUNAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v.5, n.1, p.37-50, 1986.
- HIDAKA, H. & HIRAYAMA, M. Useful characteristics and commercial applications of fructooligosaccharides. **Biochemical Society Transactions**, v.19, p.561-565, 1991.
- HIRAYAMA, M., NISHIZAWA, K. & HIDAKA, H. Production and Characteristics of Fructo-oligosaccharides, p.347-353. In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.
- KAUR, N.; KAUR, M.; GUPTA, A.K.; SINGH, R. Properties of  $\beta$ -fructosidase (Invertases and Inulinases) of *Fusarium oxysporum* Grown on an Aqueous Extract of *Cichorium intybus* Roots. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.53, p.279-284, 1992.
- KAWAMURA, M., TAKAHASHI, S. & UCHIYAMA, T. Purification and Some Properties of Inulin Fructotransferase (Depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. **Agric. Biol. Chem.** v.52, n.12, p.3209-3210, 1988.
- KAWAMURA, M. & UCHIYAMA, T. Formation of a cyclinulo-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. **Carbohydrate Research**, v.192, p.83-90, 1989.
- KIM, K.C. **J. Korean Agric. Chem. Soc.**, v.18, p.42-51, 1975a. In: VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. **Fermentation Process, Properties and Applications**. Advances in Applied Microbiology, v.29, p.139-176, 1983.
- KIM, K.C. **J. Korean Agric. Chem., Soc.** v.18, p.177-182, 1975b. In: VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. **Fermentation Process, Properties and Applications**. Advances in Applied Microbiology, v.29, p.139-176, 1983.
- KIM, C.H. & RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, v.11, n.3, p.201-206, 1989.
- KIM, DONG-MAN & KIM, HAK-SUNG, Continuous production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and Inulinase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p.336-342, 1992.

- KUNST, F., STEINMETZ, M., LEPESANT, J.A. & DEDONDER, R. Presence of a third sucrose hydrolyzing enzyme in *Bacillus subtilis*: constitutive levanase synthesis by mutants of *Bacillus subtilis* Marburg 168. **Biochimie.** v. 59, p. 287-292, 1977.
- LALOUX, OLIVIER. **Caractérisation moléculaire du gene d'inulinase de *K. marxianus* var. *marxianus* et étude de ses relations avec diverses  $\beta$ -fructosidase fonctionnellement apparentées**, Namur: Facultés Universitaire N.D. de la Paix, 175p. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Facultés Universitaire N.D. de la Paix. 1992.
- LEENHEER DE, L. & HOEBREGS, H. Progress in the Elucidation of the Composition of Chicory Inulin. **starch/stärke**, v. 46, n. 5, p. 193-196, 1994.
- LIMAMI, A. & FIALA, V. Fructan Polymerization and Depolymerization During the Growth of Chicory (*Cichorium intybus* L.) Plants, p.191-197: In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.
- McKELLAR, R.C.; MODLER, H.W. & MULLIN, J. Characterization of Growth and Inulinase Production by *Bifidobacterium* spp. On Fructooligosaccharides. **Bifidobacteria Microflora**, v. 12, n.2, p.75-86, 1993.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from Four Yeasts. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.21, p.271-274, 1988.
- MARCHAL, R., BLANCHET, D. & VANDECASTETTL, J. P. Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of Jerusalem artichokes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 23, p. 92-98, 1985.
- MARCHETTI, G. Inulina e Fruttani. **Industrie Alimentari**. n.XXXII, p.945-949, 1993.
- MEIJI SEIKA KAISHA. Process for the preparation of inulinase. Patent n° EP 0 240 741 A2, 1987.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.
- MILLER, C.H. & SOMERS, P.J.B. Degradation of levan by *Actinomyces viscosus*. **Infect. Immun.**, v.22, p.266-274, 1978.
- MITSUBISHI-CHEM. A new exo-hydrolase and the production of inutriose and inulotetraose. Patent n° JP - J02227074, 1990.
- MITSUBISHI-CHEM. New protein with cycloinulo-oligosaccharide-fructanotransferase activity. Patent n° JP07041500, 1995.
- MITSUMI-TOATSU CHEM. Preparation of inulo-oligosaccharide. Patent n°. JP - J62228293, 1987.

- MITSUI-TOATSU CHEM. Process for producing inulo-oligosaccharides. Patent n° EP 0 429 077 A2, 1990.
- MITSUI-TOATSU CHEM. Production of an inulo-oligosaccharide. Patent n°. JP - JP06014792, 1994.
- MITSUOKA, T., HIDAKA, H. & EIDA, T. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. **Die Nahrung**. v.31, n. 5-6, p.427-436, 1987.
- MÜLLER, M. & STELLER, J. Comparative studies of the degradation of grass fructan and inulin by strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* and *Lactobacillus plantarum*. **J. of Applied Bacteriology**. v. 78, p.229-236, 1995.
- MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M. & SHIOMI, N. Substrate Specificity and Subsite Affinities of  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, n.9, p.1642-1645, 1994.
- NAKAMURA, T.; HOASHI, S.; NAKATSU, S. Culture Conditions for Inulinase Production by *Aspergillus*. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v.52, n.3, p105-110, 1978.
- NAKAMURA, T., NAGATOMO, Y., HAMADA, S., NISHINO, Y & OHTA, K. Occurrence of Two Forms of Extracellular Endoinulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. **J. of Ferm. and Bioengineering**. v. 78, n. 2, 134-139, 1994.
- NORIINSHO; NIPPON-DENPUN. *Bacillus* sp. KK-4645. Patent n° JP- J62232380, oct. 1987.
- NORMAN, B.E. & HOJER-PEDERSEN, B. The Production of Fructooligosaccharides from Inulin or Sucrose Using Inulinase or Fructosyltransferase from *Aspergillus ficuum*. **Denpun Kagaku**. v. 36, n.2, p.103-111, 1989.
- ONODERA, S. & SHIOMI, N. Purification and Substrate Specificity of endo-Type Inulinase from *Penicillium purpurogenum*. **Agric. Biol. Chem.**, v.52, n.10, p.2569-2576, 1988.
- ONODERA, S. & SHIOMI, N. Purification and subsite affinities of exo-inulinase from *Penicillium trzebinskii*. **Biosci. Biotechno. Biochem.** v. 56, n.9, p.1443-1447, 1992.
- PAREKH, S. & MARGARITIS, A. Production of Inulinase ( $\beta$ -Fructan Fructanohydrolase) by *Kluyveromyces marxianus*. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, n.4, p.1085-1087, 1986.
- PASSADOR-GURGEL, G.; FURLAN, S.A.; MELLER, J.K.; JONAS, R. Application of a Microtitre Reader System to the Screening of Inulinase Producing Yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.158-161, 1996.
- PERRY, J.A.; HAAG, K.W. & GLUNZ, L.J. Programmed Multiple Development in Thin Layer Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v.11, p. 447-453, 1973.



- PESSOA JUNIOR, A.; VITOLO, M.; HUSTEDT, H. Use of  $K_{La}$  as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.37-38, 1995.
- POREP, H.; FRITZSCHE, S.; FURLAN, S.A.; HOFF, M.V.; LIETH, I.; SCHNEIDER, A.L.S.; JONAS, R. The Microtiter - System: a Screening System for New Enzymes and Microbes. **3<sup>er</sup> Congresso Latino Americano Y Nacional de Biotecnologia**. Santiago, Chile, 16-19 nov, 1993 b. Abstract Book p168.
- RAFFINERIE TIRLEMONTTOISE S.A. Raftilose. **Technical Brochure**, 1990.
- ROSA, M. F., CORREIA, I. S. and NOVAIS, J. M. Production of ethanol at high temperatures in the fermentation of Jerusalem artichoke juice and simple medium by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol. Lett.**, n. 9, p. 441-444, 1987.
- ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in *Kluyveromyces* Yeasts**. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- RUMESSEM, J.J.; Fructose and Related Food Carbohydrates. Sources, Intake, Absorption, and Clinical Implications. **Scand J. Gastroenterol.**, v.27, p.819-828, 1992.
- SCHNEIDER, A.L.S. **Estudo da Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. Florianópolis, SC, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- SEKI, K.; HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, M.; KOBAYASHI & KAINUMA, K. Production of a Novel Fructotransferase (DFAI producing) by *Arthrobacter globiformis* S14-3. **starch/stärke**, v. 40, n.11, p.440-442, 1988.
- SNYDER, H.E. & PHAFF, H.J. Studies on a  $\beta$ -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. **Journal of Microbiol. Serol.**, v.26, p.433-452, 1960.
- TOMOMATSU, H. Health Contributions of Oligosaccharides. **Third Internacional Fructan Conference**, 21-24 jul, Logan, Utah, USA, 1996. p. 17.
- UCHIYAMA, T., NIWA, S., & TANAKA, K. Purification and Properties of *Arthrobacter urefaciens* Inulase II. **Biochimica and Biophysica Acta**, n. 315, p. 412-420, 1973.
- UCHIYAMA, T. Action of *Arthrobacter urefaciens* inulinase II on Several Oligofructans and Bacterial Levans. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 397, p.153-163, 1975.
- UHM, T.B., JEON, D.Y., BYUN, S.M., HONG, J.S. & GROOTWASSINK, J.W.D. Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 926, p. 119-126, 1987.

- VAN DIJKEN, J.P. & SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugar by yeasts. **FEMS Microbiology Review**, v.32, p.199-224, 1986.
- VAN DIJKEN, J.P.; HENSING, M.; SCHEFFERS, W.A.; ROUWENHORST, R.J.; VERBAKEL, J.M.A. Physiology of *Kluyveromyces marxianus* in relation to production of extracellular proteins. **Fourth Meeting on Biology of Kluyveromyces**, 21-22 sept, Dusseldorf, 1991.
- VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. Fermentation Process, Properties and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.139-176, 1983.
- VOGEL, M. A Process for the Production of Inulin and its Hydrolysis Products from Plant Material, p.65-75. In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.
- VULLO, D.L.; COTO, C.E.; SENERIZ, F. Characteristics of an Inulinase Produced by *Bacillus subtilis* 430A, a Strain Isolated from the Rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby) **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8, p.2392-2394, 1991.
- WANG, X. & GIBSON, G. R. Effects of *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria in the human large intestine. **J. Appl. Bacteriol.**, n. 75, p. 373-380, 1993.
- WANKER, E.; HUBER, A. & SCHWAB, H. Purification and Characterization of the *Bacillus subtilis* Levanase Produced in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.5, p.19532-1958, 1995.
- WISE, W.S. **J.Gen.Microbiol.**, v.5, p.167, 1951.In: RAINER, B.W. **Determination of Volumetric Oxygen Transfer Coefficient  $K_{La}$  in Bioreactors**. Chem. Biochem. Eng., v.4, n.4, p.185-196, 1990.
- WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. Fructans of higher plants. Polysaccharide Chemistry, p.276-291, 1953.In: VERACHVERT, H. & DE MOT, R. **Yeast, Biotechnology and Biocatalysis**, v.5.Catholic University of Leuven, Belgium, 1989, 521p.
- XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Inulinase from *Chrysosporium pannorum*. **J. Ferment. Technol.**, v.66, n.5, p.553-558, 1988.
- XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Purification and Some Propertiesa of Endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*. **J. Ferment. and Bioeng.**, v.67, n.4, p.244-248, 1989.
- YOKOTA, A. HIRAYAMA, S., ENOMOTO, K., MIURA, Y, TAKAO, S & TOMITA, F. Production of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation od DFA III from inulin by the enzyme. **J. Fermentation and Bioengineering**. n.72, p.258-261, 1991.

- YOKOTA, A., YAMAUCHI, O. & TOMITA, F. Production of inulotriose from inulin by inulin-degrading enzyme from *Streptomyces rochei* E87. *Letters in Applied Microbiology*. v.21, p.330-333, 1995.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 19, p.107-117, 1996.
- ZITTAN, L. Enzymatic Hydrolysis of Inulin - An Alternative Way to Fructose Production. **Starch**, v.33, n.11, p.373-377, 1981.